



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Marcadores de activação e perfil de citocinas inflamatórias em doentes com nefropatia diabética em hemodiálise

Ana Catarina Silva Almeida

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a Doutora Ana Mafalda Fonseca

Covilhã, Junho de 2011

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora a Professora Doutora Ana Mafalda Fonseca pela orientação e disponibilidade dispensada ao longo de todo o trabalho.

Ao director clínico da *Nephrocare* - Covilhã, o Dr. José Maria Montalbán, o meu muito obrigado por ter concedido a oportunidade da realização deste estudo.

A toda a equipa do centro de diálise *Nephrocare* - Covilhã, desde enfermeiros a auxiliares, pela ajuda e disponibilidade demonstrada ao longo de todo o trabalho, com um especial obrigado à Marta Barbas pelo apoio, disponibilidade e ajuda desde o primeiro dia até ao último da realização deste trabalho.

Gostaria também de agradecer ao CICS por terem permitido a utilização das instalações e reagentes.

E por último à minha família e amigos pela ajuda, apoio e sobretudo compreensão, demonstrada ao longo deste ano de trabalho.

Resumo

A nefropatia diabética (ND) é uma complicação comum em doentes diabéticos, sendo que a maioria necessita de ser integrado em terapias de substituição renal, como a hemodiálise (HD). Estes doentes apresentam alterações no seu Sistema Imunológico, havendo poucos estudos que focam os efeitos da HD nos marcadores de activação expressos pelas sub-populações de células T, e na secreção de citocinas inflamatórias. O principal objectivo deste estudo consiste na análise da expressão de marcadores de activação em células T CD4+ e CD8+, bem como a síntese de citocinas inflamatórias, antes e após a HD.

O estudo incluiu 17 doentes com ND em hemodiálise do centro *Nephrocare* - Covilhã, e foi aprovado pela comissão de ética da *Fresenius Medical Care*. Todos os doentes assinaram um consentimento informado. Foram colhidas amostras de sangue, antes e após a sessão de HD, para a análise da percentagem relativa de células T e suas sub-populações CD4+ e CD8+, e dos marcadores de activação CD25, CD69 e CD71, nas referidas sub-populações, por citometria de fluxo. A síntese de IL-12p70, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α e IL-6, foi analisada em amostras de soro por *Cytometric Bead Array*.

Após a sessão de hemodiálise, verificou-se um aumento da razão CD4/CD8 devido a alterações significativas nas duas subpopulações. A percentagem relativa de células T CD25+ e células T CD8+CD25+ aumentou significativamente após a sessão de hemodiálise, enquanto que a percentagem relativa de células T CD69 diminuiu. A diminuição dos valores da intensidade média de fluorescência para as células T CD4+CD25+ foi estatisticamente significativa, assim como para o CD71 nas sub-populações de linfócitos T, após a sessão de hemodiálise. Em relação à análise da síntese de citocinas, verificou-se um aumento estatisticamente significativo na concentração de IL-10 e de IL-6 e uma diminuição da concentração de IL-8, após a sessão de hemodiálise, não se tendo verificado alterações significativas nas restantes citocinas inflamatórias avaliadas.

Este estudo demonstrou que há um aumento da activação celular em células T, assim como um aumento na síntese de IL-10 e IL-6, e uma diminuição de IL-8, após sessão de hemodiálise em doentes com ND.

Palavras-chave

Nefropatia diabética, Hemodiálise, Células T, Citocinas, Marcadores de activação.

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is a common complication disease in diabetic patients, and most of them need to be integrated into renal replacement therapy such as hemodialysis (HD). These patients have changes in their immune system, yet few studies focused in the effect of the HD on the activation markers expressed by T cell subsets and in the secretion of inflammatory cytokines. The main objective of this study was to access the expression of activation markers on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, as well as the synthesis of inflammatory cytokines, before and after HD.

This study involved 17 patients with DN under HD treatment at NephroCare-Covilhã, and it was approved ethics committee of Fresenius Medical Care. All patients signed an informed consent. Blood samples before and after one HD session were collected, before and after HD session, in order to analyze the relative percentages of T cells and the sub-populations CD4⁺ and CD8⁺, and the activation markers CD25, CD69 and CD71, by flow cytometry. The synthesis of IL-12p70, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α and IL-6 was analyzed in serum samples by Cytometric Bead Array.

After the HD session, there was an increase in CD4/CD8 ratio due to significant alterations in both subsets. The relative percentage of CD25⁺ T cells and CD8⁺CD25⁺ increased significantly after the HD session, while the relative percentage of CD69 T cells decreased. The decrease of the CD25 Mean Fluorescence Intensity values for CD4⁺ T was statistically different, as well as in the case of CD71 in T cell sub-populations, after HD the session. Regarding cytokine synthesis in serum samples, there was a significant increase in the concentration of IL-10 and IL-6 and a decrease in the concentration of IL-8 after HD session, and no other significant changes in the other inflammatory cytokines evaluated.

This study showed an increase in the T cell activation, as well as an increase in the synthesis of IL-10 and IL-6 and a decrease in IL-8 after HD session in patients with DN.

Keywords

Diabetic nephropathy, Hemodialysis, T cells, Cytokines, Activation markers.

Índice

	Página
1. Introdução	1
1. Imunidade	1
1.1 Imunidade Inata	1
1.2 Imunidade Adaptativa	1
1.2.1 Linfócitos	2
1.2.2 Activação dos linfócitos T	2
1.2.3 Diferenciação dos linfócitos T	3
2. Rim	5
2.1 Anatomia e fisiologia	5
2.2 Doença Renal Aguda	6
2.3 Doença Renal Crónica	7
2.4 Nefropatia Diabética	8
2.5 Tratamento da doença renal crónica	10
3. Alterações no Sistema Imunológico em doentes diabéticos hemodialisados	12
2. Materiais e Métodos	20
1. Selecção da amostra	20
2. Análise dos marcadores de activação por citometria de fluxo	21
3. Análise da apoptose celular por citometria de fluxo	24
4. Análise de citocinas	24
5. Análise estatística	26
3. Resultados	27
1. Análise de marcadores de activação em células T	27
2. Análise de citocinas	30
4. Discussão	31
5. Conclusão	35
6. Perspectivas futuras	36
7. Bibliografia	37
8. Cibergrafia	44

Lista de Figuras

	Página
Figura 1.1 Corte transversal do rim	5
Figura 1.2 Taxa de incidência da ESRD por milhão de pessoas, por selecção de grupos de doença primários, de 1980 até 2008	8
Figura 1.3 Prevalência da diabetes em Portugal, por idade e sexo, em 2009	9
Figura 1.4 Alterações da função imunológica em doentes com falha renal crónica	14
Figura 2.1 Gráfico “Dot Plot” tamanho (FSC) vs complexidade (SSC)	22
Figura 2.2 Gráfico “Dot Plot” CD3 vs complexidade (SSC)	23
Figura 2.3 Histogramas representativos da selecção da região positiva, em amostras dos controlos negativos.	23
Figura 2.4 Gráficos representativos da metodologia usada para a determinação da percentagem relativa de células T, T CD4, T CD8 e expressão de CD25, CD69 e CD71 nas subpopulações de células T.	24
Figura 2.5 Diluições efectuadas para a formação da curva de calibração.	25

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1.1 Classificação da doença renal crónica baseada na taxa de filtração glomerular	7
Tabela 1.2 Principais estudos das células envolvidas na imunidade de doentes com ESRD, DN e falha crónica renal que façam tratamento de diálise	16
Tabela 2.1 Características clínicas e laboratoriais da população em estudo	20
Tabela 2.2 Anticorpos utilizados nas experiências de citometria de fluxo	21
Tabela 2.3 Combinação dos anticorpos e quantidade usada para a análise da população de linfócitos por citometria de fluxo	22
Tabela 2.4 Concentração e respectivas diluições dos tubos de controlo	26
Tabela 3.1 Valores de média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos das percentagens relativas das células T, suas sub-populações (CD4 e CD8) e razão CD4/CD8, antes e após hemodiálise	27
Tabela 3.2 Valores de média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos das percentagens relativas da expressão de CD25, CD69 e CD71 em células T e suas sub-populações (CD4 e CD8), antes e após hemodiálise	28
Tabela 3.3 Valores da média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos da <i>Mean Fluorescence Intensity</i> (MFI) das células T e suas sub-populações (CD4 e CD8) que expressam os marcadores CD25, CD69 e CD71, antes e após hemodiálise	29
Tabela 3.4 Valores de média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos da concentração das citocinas IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, antes e após hemodiálise	30

Lista de Gráficos

	Página
Gráfico 3.1 Percentagens relativas das células T, suas sub-populações (CD4 e CD8) e razão CD4/CD8, antes e após hemodiálise, em 17 doentes diabéticos hemodialisados	27
Gráfico 3.2 Percentagens relativas da expressão dos marcadores CD25, CD69 e CD71 em células T e suas sub-populações (CD4 e CD8), antes e após hemodiálise, em 17 doentes diabéticos hemodialisados	28
Gráfico 3.3 Valores da Mean Fluorescence Intensity (MFI) das células T e suas sub-populações (CD4 e CD8) que expressam os marcadores de activação CD25, CD69 e CD71, antes e após hemodiálise, em 17 doentes diabéticos hemodialisados	29
Gráfico 3.4 Valores de concentração das citocinas inflamatórias IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, antes e após a sessão de hemodiálise, expressos em pg/mL	30

Lista de Acrónimos

APC	<i>Allophycocyanin</i>
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BD	<i>Becton Dickinson</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CTL	Linfócitos T citotóxicos
D.M.P.	Doentes por milhão de população
DP	Diálise Peritoneal
DRC	Doença renal crónica
ESRD	Doença renal em fase terminal
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FRC	Falha renal crónica
HD	Hemodiálise
IFN- γ	Interferão gama
IL	Interleucina
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	Complexo maior de Histocompatibilidade
ND	Nefropatia diabética
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	<i>Binding Buffer</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF	Taxa de filtração glomerular
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
Treg	Linfócitos T <i>regulatory</i>

Capítulo 1

Introdução

1- Imunidade

O conjunto de processos fisiológicos que permite ao organismo reconhecer corpos estranhos ou anormais, com consequente neutralização ou eliminação, designa-se por imunidade. Este processo é dividido em dois tipos de respostas inter-relacionadas, a resposta imunológica inata e a resposta imunológica adaptativa [in Arosa *et al*, 2007].

1.1- Imunidade Inata

A imunidade inata inclui o conjunto de processos através dos quais o organismo previne a entrada de agentes estranhos, através do reconhecimento, fagocitose e digestão dos patogénios, indução da inflamação e apresentação dos antigénios. O suporte do seu funcionamento apoia-se em vários factores tais como, factores mecânicos, químicos, fisiológicos e humorais, e o papel das células fagocíticas e linfocíticas, células dendríticas, mastócitos e basófilos [in Arosa *et al*, 2007]. Os receptores da imunidade inata são expressos em muitas células efectoras, incluindo macrófagos e células apresentadoras de antigénios (APCs). O reconhecimento dos patogénios é um processo rápido e é caracterizada pelos padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs). Estes padrões são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões de sinalização, activando vias de transdução de sinal que induzem genes para citocinas inflamatórias [Kato *et al*, 2008]. Uma das famílias que pertence a este sistema é a família dos *Toll Like Receptors* (TLR). A função destes receptores consiste na promoção da fagocitose e activação da via do complemento e de algumas citocinas, tal como a IL-1 β (Interleucina 1 β), IL-6 (Interleucina 6), e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*). Além destas funções, estes receptores estão também envolvidos na maturação de células dendríticas apresentadoras de antigénios, aumentando a expressão de moléculas co-estimulatórias, envolvidas na activação de linfócitos [Hajishengallis *et al*, 2010].

1.2- Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa consiste na geração de anticorpos específicos (resposta humoral) e/ou a produção de células efectoras capazes de reconhecerem e atacarem (acção citotóxica) as células portadoras de antigénios estranhos (resposta celular). Este processo inclui a activação de linfócitos, nomeadamente os linfócitos B e os linfócitos T. Ambos têm origem na medula óssea sendo que a maturação dos linfócitos T ocorre no timo [in Arosa *et al*, 2007].

1.2.1- Linfócitos

Os linfócitos B contêm um receptor que apresenta a estrutura de uma imunoglobulina, onde são capazes de se ligar a antígenos. Quando activados, os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos, sendo capazes de produzir anticorpos. Estes quando se ligam aos antígenos sinalizam-nos para destruição por outras células do Sistema Imunológico. Assim, os linfócitos B fazem parte da imunidade humoral [in Arosa *et al*, 2007].

Os linfócitos T são caracterizados pela presença do seu receptor específico, o TCR (*T cell Receptor*), um receptor de célula T responsável pelo reconhecimento do antígeno, e é expresso na membrana plasmática em associação com um complexo de sinalização denominado CD3. O TCR é responsável pela tradução do reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T, em sinais intracelulares [in Arosa *et al*, 2007].

1.2.2- Activação dos linfócitos T

A proliferação e diferenciação dos linfócitos T ocorre quando um linfócito T reconhece um antígeno combinado com uma molécula do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APCs). O TCR apenas reconhece antígenos que sofreram um processamento e que são apresentados à superfície de células associadas a este tipo de moléculas [in Abbas *et al*, 2007]. Existem dois tipos de moléculas MHC, as moléculas MHC classe I, que se encontram presentes em quase todas as células com núcleo, e as moléculas MHC classe II, que se encontram expressas em linfócitos B, monócitos/macrófagos e células dendríticas [in Arosa *et al*, 2007].

As moléculas CD4 e CD8 actuam como co-receptores de linfócitos T, e são considerados co-receptores pois participam activamente no reconhecimento do complexo MHC:péptido pelos linfócitos T através da formação de complexos oligoméricos com o TCR/CD3, e porque também participam na transdução dos sinais de activação provenientes do TCR/CD3 através da activação de uma proteína cinase de tirosina intracelular, o Lck. Assim, os linfócitos T podem dividir-se em duas populações, os linfócitos T CD4+ e os linfócitos T CD8+. Os linfócitos T CD4+ são seleccionados por moléculas de MHC classe II e representam cerca de 50% dos linfócitos em circulação [in Arosa *et al*, 2007]. Este tipo de células quando abandona o timo podem ser activados por antígenos para se diferenciarem em células T auxiliares, cuja função principal é mediada por proteínas específicas membranares e pela produção de citocinas [in Abbas *et al*, 2007]. Os linfócitos T CD8+ são seleccionados por moléculas de MHC classe I e representam cerca de 25% dos linfócitos em circulação [in Arosa *et al*, 2007]. Este tipo de células pode diferenciar-se em linfócitos T citotóxicos cuja função principal é a morte de células alvo infectadas [in Abbas *et al*, 2007].

A proliferação dos linfócitos T *naive* ocorre com dois sinais. O primeiro sinal vai conferir especificidade à resposta do linfócito T, sendo que ocorre com a ligação do complexo TCR/CD3 presente nos linfócitos CD4+ e CD8+, pelas moléculas de MHC classe II e MHC classe I, respectivamente. O segundo sinal é transmitido pelos co-receptores CD4 e CD8, assim como pelo receptor CD28. Este receptor interage com dois receptores da família B7, o CD80 e o CD86. Enquanto que este último é expresso só por APCs e tem um papel mais relevante durante os momentos iniciais da activação, o CD80 é induzido após activação e tem um papel mais tardio, mais concretamente durante a sustentação do processo de activação e proliferação. Quando os linfócitos T *naive* são activados proliferam como resposta a um antigénio promovida pela interleucina-2 (IL-2). Esta citocina promove sinais autócrinos às células T activadas, levando à expansão dos clones. A IL-2 e outras citocinas produzidas pelas células T e pelas APCs também estimulam a diferenciação das células T em células efectores e de memória [Smith-Garvin *et al*, 2009].

Esta fase inicial de expansão é sempre seguida por uma fase de contracção durante a qual alguns dos linfócitos T *naive* inicialmente activados sofrem morte celular programada ou apoptose, enquanto que os outros sobrevivem. Esta fase é determinada, em parte, por alterações na expressão de receptores à superfície dos linfócitos T após activação, ou seja, os linfócitos T *naive* que não se ligam ao MHC classe I ou classe II, entram em apoptose, sendo eliminados [in Arosa *et al*, 2007].

1.2.3- Diferenciação dos linfócitos T

O processo que converte os linfócitos T *naive*, que sobrevivem no processo de apoptose, em linfócitos T de memória e/ou efectores, com funções diferentes, é conhecido por diferenciação. Após activação, os receptores funcionam como marcadores de diferenciação, incluindo os receptores para citocinas e factores de crescimento, como por exemplo, o CD69 (expresso pelas células T após a ligação do complexo do receptor das células T), a cadeia α do receptor para a IL-2 (CD25) (receptor expresso minutos ou horas após activação) e o receptor para a transferrina (CD71) (receptor expresso horas-dias após activação) [in Arosa *et al*, 2007].

Os linfócitos T CD4+, após activação, diferenciam-se em duas grandes subpopulações: os linfócitos Th1 e os linfócitos Th2. A diferenciação em linfócitos Th1 é realizada pela activação de um linfócito Th CD4+ *naive* por uma célula dendrítica, resultante da secreção de interleucina 2 (IL-2) e interferão gama (IFN- γ) pela APCs e no aumento de expressão do receptor para a IL-2 e IFN- γ pelo linfócito T. Este tipo de linfócitos são responsáveis por promover respostas imunológicas contra bactérias e vírus, mediada por outros tipos de linfócitos, tais como T CD8+, NKT e NK. Enquanto que os linfócitos Th1 estão envolvidos na regulação de respostas celulares, os linfócitos Th2 estão envolvidos na regulação de respostas humorais. Esta é realizada através da secreção de citocinas como a IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-

13, onde algumas ajudam os linfócitos B a proliferar e a diferenciarem-se em plasmócitos produtores de imunoglobulinas. A diferenciação em linfócitos Th2 ocorre quando um linfócito Th CD4+ *naive* é activado por uma célula dendrítica, levando a secreção de IL-4 e ao aumento de expressão do receptor para a IL-4 pelo linfócito T. Este tipo de linfócitos promove a produção de anticorpos por linfócitos B, assim como respostas mediadas por eosinófilos e mastócitos [in Arosa *et al*, 2007].

Devido à associação entre a interleucina IL-23 e a expressão de IL-17, uma nova linhagem de células Th, as células Th17, foi identificada. Estas células não produzem as típicas citocinas Th1/Th2, onde as citocinas IL-4 e IFN- γ suprimem a diferenciação das células Th17. São induzidas na presença de IL-6 e TGF- β (*Transforming growth factor beta*) e produzem citocinas como a IL-21, IL-22 e duas subpopulações de IL-17, a IL-17a e a IL-17f. Este tipo de células encontra-se envolvido nas respostas imunológicas contra bactérias extracelulares e fungos, e são responsáveis pela indução de muitas doenças auto-imunes. A IL-6 é produzida por células do Sistema Imunitário inato e é um indutor da diferenciação de células Th17, através da TGF- β , sendo também um indutor na produção de IL-21 e expressão de IL-23R [Kimura *et al*, 2011].

Os linfócitos T CD8+ *naive*, após activação, passam por uma fase de expansão e contracção, para a formação de linfócitos de memória. Um dos principais indicadores de diferenciação deste tipo de linfócitos é o receptor CD28. Este receptor encontra-se presente na superfície de quase todos os linfócitos T CD8+ *naive*, sendo que diminui progressivamente com o processo de diferenciação. Assim sendo, em linfócitos T CD8+ de memória efectores deixam de ter expresso este tipo de receptor. Além dos linfócitos T CD8+ de memória efectores, os linfócitos T CD8+ *naive* também podem dar origem aos linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTL), dependendo do tipo de célula apresentadora e da presença, ou não, de determinadas citocinas no local onde o linfócito T CD8+ é activado. Este tipo de linfócitos tem a capacidade de produzir grânulos citotóxicos, com a função de eliminar células-alvo [in Arosa *et al*, 2007].

A expressão da cadeia α do receptor para a IL-2 (CD25), além de ser um marcador de linfócitos T activados, é utilizada para identificar outro tipo de linfócitos, os linfócitos TCR $\alpha\beta$ reguladores ou Treg (T *regulatory*) [in Arosa *et al*, 2007]. Este tipo de linfócitos empenha um papel crucial na manutenção da auto-tolerância [Zhu *et al*, 2008], bem como a supressão de respostas imunológicas mediadas por outros linfócitos T através de contacto celular e independente de antígeno. Estas células tanto podem ser CD4+ como CD8+, e são caracterizadas pela expressão do factor de transcrição Foxp3 e do CD25, onde se podem dividir em dois grupos, os naturais (CD4+CD25+) e os induzidos ou adaptativos (CD4+CD25+, CD8+CD25+, CD8+CD28-) [in Arosa *et al*, 2007]. As células Treg CD4+ expressam elevados níveis de CD25, e juntamente com a ausência da expressão de IL-7R α , distinguem-se das outras células. Tanto o TGF- β como o IL-2 são importantes na diferenciação e sobrevivência das células Treg, sendo que o TGF- β é também uma citocina produzida por este tipo de

células. Para além desta, a IL-35 e a IL-10 são também produzidas por estas células, onde são responsáveis pela tolerância imunológica, pela regulação das respostas imunológicas e pela homeostase dos linfócitos [Zhu *et al*, 2008]. Os linfócitos Treg CD8+ são caracterizados pela ausência do receptor CD28 e têm a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos T específicos para um determinado antígeno (linfócitos Th1/Th2) [in Arosa *et al*, 2007].

2- Rim

2.1- Anatomia e fisiologia

Os rins são dois órgãos simétricos situados na parte mais alta e posterior da cavidade abdominal, em cada lado da coluna vertebral, na região lombar. Têm uma forma oval característica, semelhante à de um feijão [in Feehally *et al*, 2007].

O rim quando cortado ao meio divide-se em várias secções: medula, papila, cálice e pelve renal. A pelve renal encontra-se ligada a ureter, que posteriormente se liga à bexiga (figura 1.1) [in Guyton, 2006].

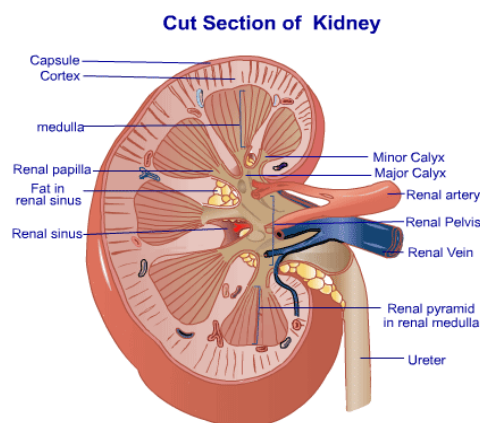


Figura 1.1: Corte transversal do rim [http://www.leechestherapy.com/kidney_disease.php]

Têm como funções: a remoção de resíduos, excesso de água e células resultantes da desagregação do tecido muscular (devido ao uso normal), manutenção em equilíbrio dos fluidos e electrólitos, controlo da pressão sanguínea, manutenção do equilíbrio ácido-base, e produção de hormonas [in Guyton, 2006].

Os componentes principais internos são os nefrónios e o ducto colector. O rim humano contém aproximadamente um milhão de nefrónios, contudo este número é variável. Os nefrónios são um glomérulo conectado por um túbulo até ao ducto colector [in Feehally *et al*, 2007]. O glomérulo é uma rede de cerca de 50 capilares paralelos, ramificados, cobertos por células epiteliais e envolvidos pela cápsula de Bowman. A pressão do sangue no glomérulo leva a filtração do líquido para o interior da cápsula de Bowman e, a partir daí, o líquido flui para o

túbulo proximal, localizado no córtex renal. Do túbulo proximal, o líquido passa pela ansa de Henle, até ao túbulo distal, que tal como o túbulo proximal fica no córtex renal. A seguir, ainda no córtex, oito dos túbulos distais juntam-se para formar o túbulo colector, cuja extremidade se afasta novamente do córtex e se dirige inferiormente para a medula, onde passa a constituir o canal colector. Os canais maiores lançam-se na pelve renal pelas pontas da papila renal [in Guyton, 2006].

À medida que o filtrado glomerular flui através dos túbulos, mais de 99% da sua água e quantidades variáveis dos seus solutos são reabsorvidos normalmente para o sistema vascular, e pequenas quantidades de algumas substâncias são também secretadas para os túbulos. O restante da água tubular e das substâncias dissolvidas passa a constituir a urina [in Guyton, 2006].

A função básica do nefrónio consiste em limpar ou “depurar” o plasma sanguíneo de substâncias indesejadas ao passar através do rim. As substâncias que precisam ser retiradas incluem particularmente os produtos terminais do metabolismo, como a ureia, creatinina, ácido úrico e uratos. Além disso, muitas outras substâncias, como iões sódio, potássio, cloro e hidrogénio, tendem a acumular-se no corpo em quantidades excessivas. O nefrónio tem também como função depurar o plasma desses excessos [in Guyton, 2006].

A formação da urina é devida a 3 principais mecanismos: filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular. O nefrónio depura o plasma das substâncias desnecessárias por filtração, através da membrana glomerular, para dentro dos túbulos do nefrónio. Posteriormente, à medida que esse filtrado flui através dos túbulos, as substâncias desnecessárias não são reabsorvidas, enquanto que as substâncias necessárias, especialmente a água e alguns electrólitos, são reabsorvidas de volta para o plasma dos capilares peritubulares. Ou seja, as funções necessárias do líquido tubular retornam ao sangue, enquanto que as porções indesejadas passam para a urina. As substâncias desnecessárias são também secretadas a partir do plasma directamente através das células epiteliais que revestem os túbulos, sendo lançadas no líquido tubular. Assim sendo, a urina que acaba por ser formada é não só composta por substâncias filtradas, como também por pequenas quantidades de substâncias secretadas [in Guyton, 2006].

2.2- Doença renal aguda

A doença renal aguda é um síndrome, assintomático, que consiste numa diminuição da taxa de filtração glomerular abrupta, suficiente para diminuir a eliminação de produtos azotados (ureia e creatinina) [in Fauci *et al*, 2009]. Além desta manifestação clínica, também a oligúria (débito urinário menor que 400 mL/dia, que contribui para a sobrecarga dos líquidos extracelulares) e os distúrbios electrolíticos e ácido-base contribuem para a manifestação clínica da doença. As causas desta doença são geralmente classificadas em três grupos:

- Doenças que causam hipoperfusão renal e comprometem a função renal sem lesão parenquimatosa bem definida (insuficiência renal aguda ou azotemia pré-renal);
- Doenças que afectam directamente o parênquima renal (insuficiência renal aguda intrínseca);
- Doenças associadas à obstrução do trato urinário (insuficiência renal aguda pós-renal).

Esta doença é normalmente reversível, embora a recuperação das concentrações séricas basais de creatinina depois da lesão renal possam não apresentar valores sensíveis para detectar danos irreversíveis clinicamente significativos, que levam ao desenvolvimento de doença renal crónica [*in Fauci et al*, 2009].

2.3- Doença renal crónica

A doença renal crónica resulta na destruição irreversível e progressiva dos nefrónios [*in Fauci et al*, 2009]. Independentemente da causa, define-se como um dano no rim ou uma taxa de filtração glomerular $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ durante 3 meses ou mais. Com base na gravidade da doença, esta apresenta uma classificação dividida em 5 estádios [*in Feehally et al*, 2007] (Tabela 1.1), onde os doentes com insuficiência renal crónica do estádio 3 ao 5 têm uma maior probabilidade de vir a desenvolver doença renal em fase terminal [Blicklé *et al*, 2007].

Tabela 1.1: Classificação da doença renal crónica baseada na taxa de filtração glomerular

Estádio	Descrição	Taxa de filtração glomerular (TGF) (ml/min/1,73 m ²)
1	Lesão renal com TGF normal ou elevada	≥ 90
2	Lesão renal com redução discreta da TGF	60 a 89
3	Redução moderada da TGF	30 a 59
4	Redução grave da TGF	15 a 29
5	Insuficiência renal	<15 (ou diálise)

Fonte: National Kidney Foundation: American Journal of kidney disease, 39(2 Suppl.1): S1: 2002

Devido aos tratamentos agressivos para a glomerulonefrite, diabetes *mellitus* e hipertensão, estas doenças são as maiores causas da doença renal crónica (figura 1.2) [*in Fauci et al*, 2009].

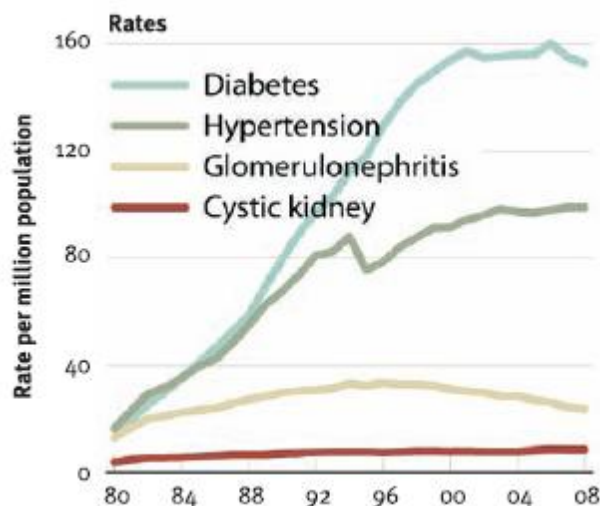


Figura 1.2: Taxa de incidência da ESRD por milhão de pessoas, por selecção de grupos de doença primários, de 1980 até 2008 [Adaptado de Gorriz, 2011].

Independentemente das causas da doença, a consequência da redução do número de nefrónios é a alteração da função de todos os órgãos do corpo. Urémia é o termo usado no síndrome, que resulta da perda da função renal [in Fauci *et al*, 2009].

2.4- Nefropatia diabética

A diabetes *mellitus* é uma desordem metabólica caracterizada por uma hiperglicémia crónica com distúrbios no metabolismo dos carboidratos, ácidos gordos e proteínas. Estes distúrbios metabólicos resultam dos defeitos na secreção de insulina, da acção da insulina, ou de ambos. A diabetes é também associada a taxas elevadas de doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral, doença e falha renal, retinopatia e cegueira, assim como doença vascular periférica, neuropatia, e amputação [in Boner *et al*, 2003].

A nível mundial, a prevalência da diabetes foi estimada em 2,8 % em 2000 e 4,4% em 2030. Este número tem vindo a aumentar devido principalmente ao crescimento da população, à idade, urbanização, e ao aumento da prevalência da obesidade e sedentarismo [Wild *et al*, 2004]. O número total de pessoas com diabetes está projectado para aumentar de 171 milhões em 2000 para 366 milhões em 2030 [Broumand, 2007]. A nível global, a prevalência da diabetes é semelhante nos homens e nas mulheres mas é ligeiramente superior em homens com menos de 60 anos e em mulheres com idades mais avançadas, no entanto existem mais mulheres com a doença do que homens [Wild *et al*, 2004].

Estudos recentes, datados de 2009, estimam que a prevalência da Diabetes *mellitus* em Portugal, em 2008, era de 11,7 %, correspondendo a aproximadamente 905 mil indivíduos, tendo sido mais frequente em homens (14,2%) e na faixa etária dos 60 aos 79 anos (figura 1.3) [www.portaldasauade.pt/NR/rdonlyres/4747F2BE-D534-4983-9A94-C5B7066C9731/0/i012326.pdf].

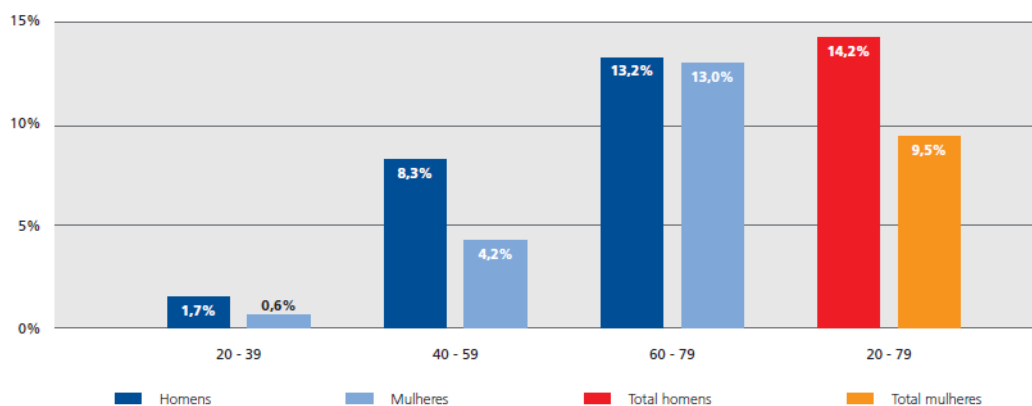


Figura 1.3: Prevalência da diabetes em Portugal, por idade e sexo, em 2009 [www.portaldasauade.pt/NR/rdonlyres/4747F2BE-D534-4983-9A94-C5B7066C9731/0/i012326.pdf].

Existem dois tipos de diabetes, a diabetes tipo 1 e a diabetes tipo 2. Ambas encontram-se associadas ao aumento do risco de várias condições, incluindo arteriosclerose com doença coronária e falha cardíaca, hipertensão, doença vascular periférica, retinopatia e/ou doença cerebrovascular. A diabetes *mellitus* apresenta também um envolvimento renal, numa percentagem elevada de doentes. Uma percentagem de 25-45% de diabéticos com diabetes tipo 1 e tipo 2 tem tendência para desenvolver doença renal [in Boner *et al*, 2003].

A diabetes tipo 1, ou diabetes *mellitus* insulino-dependente, é uma doença autoimune crónica. Isto é devido à elevada destruição mediada pela autoimunidade das células β , nos ilhéus pancreáticas de *Langerhans*, com consequente deficiência de insulina e hiperglicémia, requerendo terapia de insulina durante o resto da vida. Nem toda a perda de células β é devido à autoimunidade, um facto que leva à subclassificação da diabetes tipo 1 em tipo 1a, relacionada com a doença auto-imune, e tipo 1b, que constitui uma doença não mediada por imunidade. Este tipo de diabetes engloba cerca de 10% de todo o tipo de diabetes primária, sendo uma das doenças crónicas mais comuns em crianças, com uma taxa de prevalência de 0,2-0,5% em muitas populações caucasianas. Anualmente, a incidência da diabetes tipo 1 está a aumentar [in Boner *et al*, 2003].

A diabetes tipo 2, formalmente conhecida como diabetes não insulino-dependente, é a forma mais comum de diabetes, e é caracterizada pela desordem da acção e secreção de insulina. A sua frequência encontra-se a aumentar em todo o mundo. Enquanto que a sua susceptibilidade genética é normalmente um pré-requisito no desenvolvimento de diabetes, a

exposição aos factores ambientais é responsável pela expressão clínica da doença. Este tipo de diabetes é caracterizado pela resistência à insulina nos músculos, fígado e tecido adiposo. É também relativa ou absoluta a deficiência na secreção de insulina, apesar das concentrações absolutas de insulina se encontrarem normalmente elevadas ou normais no início da doença. Uma deterioração progressiva da função das células B ocorre com o aumento da duração da doença, logo eventualmente as concentrações de insulina sub-normais prevalecem [*in Boner et al*, 2003].

A nefropatia diabética (ND), ou seja, a existência de danos nos rins em diabéticos, ocorre como o resultado de ambas as acções directas e indirectas da glucose, que activa várias vias envolvidas na patogénese da DN. Isto inclui stress oxidativo, glicação avançada e activação de certas citocinas. Outros factores que são precisos ter em conta incluem a hipertensão, arteriosclerose e os efeitos tóxicos da exposição das células tubulares às proteínas [*in Boner et al*, 2003]. A nefropatia diabética tem uma prevalência de 60% em doentes com diabetes tipo 1, sendo que em doentes com diabetes *mellitus* tipo 2 se verifique uma prevalência mais baixa, a rondar os 10% [Belchetz *et al*, 2003].

A nefropatia diabética eventualmente resulta em doença renal em fase terminal (ESRD) [*in Boner et al*, 2003], tendo uma incidência de 4,3% em doentes com diabetes *mellitus* tipo 1 e 40,5% com diabetes *mellitus* tipo 2 [The United States Renal Data System, Annual Data Report 2010]. Nos últimos anos têm sido aceites mais doentes com nefropatia diabética em programas terapêuticos de substituição renal. Doentes diabéticos nestes programas são susceptíveis de desenvolver complicações adicionais e requerem tratamento intensivo, não só no manuseamento destas condições específicas mas também no melhoramento da sua qualidade de vida [*in Boner et al*, 2003].

2.5- Tratamento da doença renal crónica

Nos últimos anos, a diálise e o transplante têm vindo a prolongar a vida de muitas pessoas com insuficiência renal. O tratamento na doença renal aguda é diferente do da doença renal crónica devido à característica irreversível desta última [*in Fauci et al*, 2009]. Em Portugal, a percentagem de doentes diabéticos com Insuficiência Renal Crónica a efectuar hemodiálise ronda os 25% [Correia, 2009].

Os doentes que apresentem uma doença renal crónica nos últimos estádios, muitas agências passam a designá-la como doença renal de fase terminal (ESRD). Inicialmente, doentes com ESRD começam com terapia de conservação, mas eventualmente podem precisar de hemodiálise (HD), diálise peritoneal (DP) e/ou transplantação [*in Fauci et al*, 2009]. Estudos relativos a 2004, demonstram que mais de 1.7 milhões de pessoas, a nível mundial, se encontravam sob tratamento para a ESRD [Grassmann *et al*, 2005], sendo que a incidência

tende a aumentar aproximadamente 8% anualmente [Schieppati *et al*, 2005]. Desses 1.7 milhões, 412 000 efectuaram transplante, 1 222 000 foram submetidos a HD e 149 000 a PD. Assim sendo, o resultado da média de prevalência global dos doentes em tratamento para ESRD e dos doentes em diálise foi de 280 e 215 doentes por milhão de população (d.m.p), respectivamente. Até ao final de 2004, o tratamento de diálise mais frequente foi a hemodiálise, representando 89% de todos os doentes em diálise, sendo que, a DP só abrangeu 11% dos doentes em diálise. A nível mundial, a prevalência mais alta desta doença encontra-se no Japão, seguida dos Estados Unidos da América. Na Europa, Portugal, Alemanha, Chipre, Espanha e Itália são dos países com maiores taxas de prevalência (entre os 1000 e 1160 d.m.p) [Grassmann *et al*, 2005]. Nos países desenvolvidos, a idade média dos doentes com ESRD que necessitam de diálise é de 60 a 63 anos, valor este, muito mais elevado quando comparado com a idade média dos países em desenvolvimento, de 32 a 42 anos [Kher, 2002].

As terapias para as doenças renais não devem ser realizadas quando o doente se encontra totalmente assintomático contudo, a diálise e/ou o transplante convém ser iniciada o mais precoce possível para prevenir complicações sérias. A mudança do tratamento convencional para a diálise ou transplante é determinado pela qualidade de vida do doente e os riscos que os tratamentos possam ter [in Fauci *et al*, 2009].

O transplante é tido em consideração só quando o tratamento conservador falha, quando não há outros tratamentos reversíveis para a falha renal, e quando o indivíduo se encontra muito doente, incapaz de realizar outros métodos de tratamento [in Fauci *et al*, 2009].

A diálise peritoneal é um tratamento para a ESRD, que representa aproximadamente 8% a 9% do total de pessoas que fazem diálise. Nesta técnica, a cavidade peritoneal, ou seja, o maior espaço seroso no corpo, é usado para conter 2 a 2,5 litros de fluído de diálise, que é trocado 4 a 5 vezes por dia através de um cateter interior permanente. A membrana peritoneal via capilares peritoneais actua como uma membrana de diálise endógena. Através desta membrana, os resíduos difundem para o dialisado, enquanto que o fluído em excesso é removido por osmose induzida pela glucose ou outro agente osmótico do fluído de diálise, denominado de ultrafiltração [in Feehally *et al*, 2007]. Este tipo de diálise aplica-se principalmente em doentes que apresentem uma função renal residual. A maioria dos doentes que começa com este tipo de diálise eventualmente, passado alguns anos, necessita de mudar para outros tipos de tratamento, como por exemplo a hemodiálise. No entanto, são raros os doentes que mudam de tratamento de hemodiálise para diálise peritoneal. Este tipo de diálise apresenta como vantagens um lento, contínuo modo fisiológico de remoção de pequenos solutos e do excesso de água corporal, associado com uma aparente química sanguínea e estado de hidratação corporal estável. A diálise peritoneal não necessita de acesso vascular nem de uma membrana de contacto com o sangue, fazendo com que o estímulo catabólico seja menos proeminente que na hemodiálise, e é um tipo de diálise que pode ser realizada em casa, permitindo uma qualidade de vida melhor [in Feehally *et al*,

2007]. A principal desvantagem é o facto do tempo de tratamento ser elevado, envolvendo continuamente o doente [*in Fauci et al*, 2009].

A hemodiálise é um processo de difusão através de uma membrana semipermeável que remove substâncias indesejáveis do sangue enquanto adiciona componentes desejáveis. Um fluxo constante num lado da membrana e uma solução de limpeza (dialisado) no outro lado permite a remoção dos resíduos por transporte difuso. Por alteração da composição do dialisado, o método de exposição do sangue e o dialisado (geometria do dialisador), o tipo e a superfície da área da membrana da diálise, e a frequência e a duração de exposição, permitem que doentes sem função renal se mantenham com um estado de saúde relativo [*in Fauci et al*, 2009]. A maior vantagem deste tipo de diálise é o facto do tratamento se realizar num curto espaço de tempo e com pouca interrupção no estilo de vida entre os tratamentos. É mais eficiente que a diálise peritoneal, permitindo mudanças rápidas nos valores séricos anormais. A hemodiálise pode ser realizada em casa, mas os pacientes necessitam de assistência durante o tratamento [*in Fauci et al*, 2009].

3- Alterações no Sistema Imunológico em doentes diabéticos hemodialisados

Uma das características da função renal é a concentração elevada de ureia no sangue, denominada urémia. A elevada concentração deste composto leva a que os doentes apresentem também hipercitocinémia, provavelmente devido a acumulação de citocinas pró-inflamatórias, consequência da diminuição da eliminação renal [Kimmel *et al*, 1998; Stenvinkel *et al*, 2005]. Por outro lado, a urémia encontra-se também associada à imunossupressão devido ao impacto do *milieu* urémico e à variedade das desordens associadas às células imunocompetentes [Kato *et al*, 2008].

Doentes que se encontram em hemodiálise crónica, têm uma tendência elevada para desenvolver infecções e têm uma elevada incidência em contrair doenças, relacionada com as respostas imunológicas [Descamps-Latscha *et al*, 1996]. Os defeitos no Sistema Imunitário ocorrem tanto nas respostas humorais como nas respostas celulares, mas apresentam uma maior evidência na imunidade celular [Descamps-Latscha *et al*, 1996; Descamps-Latscha *et al*, 1993].

Na ausência de infecções, os doentes com falha renal crónica apresentam, normalmente, níveis normais de leucócitos [Girndt *et al*, 2001]. Apesar disso encontram-se casos de linfopénia de células B e T, estando associada à terapia renal [Fernandez-Fresnedo *et al*, 2000; Kurz *et al*, 1986], sendo que a linfopénia de células B é uma das características do estágio 5 da doença renal crónica [Litjens *et al*, 2006]. Outra das características desta doença

é a diminuição da activação de células T, podendo ser estudada através das moléculas CD69 [Dietzmann *et al*, 2002; Meier *et al*, 2007] e CD25 (receptor α da IL-2) [Girndt *et al*, 2001; Sester *et al*, 2000; Girndt *et al*, 1999], bem como a relação CD4/CD8 [Girndt *et al*, 1993]. Outro meio para verificar a activação das células T é através da quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α . Assim sendo, o tratamento por hemodiálise e a urémia têm influência sobre os monócitos, ocorrendo uma sucessiva activação do complemento. Estas células são activadas para a produção de elevados níveis destas citocinas, em que quanto mais elevados os níveis, mais baixa é a activação das células T [Girndt *et al*, 2001; Girndt *et al*, 1998; Herbelin *et al*, 1990].

Um dos sinais que actua directamente na indução da IL-2 é transmitido através das moléculas da família B7. Estas moléculas constituem um dos mais importantes sinais co-estimulatórios das APCs para as células T, através da interacção com o CD28, localizado na superfície destes linfócitos [Greenfield *et al*, 1998]. Alguns estudos direccionados à avaliação da expressão deste tipo de moléculas, nomeadamente da B7-1 (CD80) e da B7-2 (CD86), sugerem que a redução da activação de células T não é devido às próprias células mas sim às APCs [Girndt *et al*, 2001], encontrando-se valores reduzidos da expressão da B7-2 [Girndt *et al*, 2001; Girndt *et al*, 1999], levando posteriormente a uma redução na relação entre o segundo sinal (B7-2) e o primeiro sinal (HLA classe II) [Girndt *et al*, 1999].

Como referido anteriormente, existem dois tipos de células auxiliares: Th1, que secreta a citocina IFN- γ , (inibe a diferenciação das células Th2) e a Th2, que produz interleucinas IL-4 e IL-10 (inibe a secreção de IFN- γ e a imunidade celular) [Libetta *et al*, 2001]. Os valores de IL-4 e IL-10 encontram-se elevados em doentes com falha renal crónica [Alvarez-Lara *et al*, 2004], sendo que estes valores elevados de IL-10 também ocorrem em doentes com nefropatia diabética e ESRD. O aumento da produção de IL-10 pode representar uma resposta auto-regulatória para aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos [Kamel *et al*, 2009]. Em doentes em hemodiálise, o aumento da síntese e secreção desta citocina é devido ao contacto com a membrana do dialisado [Brunet *et al*, 1998].

Em doentes em diálise, a redução da IL-2 tem como consequência uma redução da activação das células Th1 e Th2, pois esta citocina encontra-se envolvida na expansão de ambas as linhas celulares. Contudo, estudos revelam que em casos de falha renal crónica, há uma indução para a tendência da diferenciação de células Th1 [Sester *et al*, 2000], consequentemente levando ao aumento da razão Th1/Th2 [Ando *et al*, 2005; Sester *et al*, 2000; Nitta *et al*, 2002; Daichou *et al*, 1999]. Dois dos grandes promotores da diferenciação das Th1 são a IL-12 (secretada por APCs) e o IFN- γ . A IL-12 encontra-se sobre-expressa nos monócitos de doentes hemodialisados, enquanto que relativamente ao valores de IFN- γ existem opiniões diferentes. Estudos mais antigos relatam níveis de IFN- γ baixos [Sester *et al*, 2000], mas outros autores demonstraram que doentes com falha renal crónica e nefropatia diabética, apresentam níveis elevados desta citocina [Kamel *et al*, 2009; Alvarez-Lara *et al*,

2004; Fodor *et al*, 2002]. Ao contrário do IFN- γ , a IL-12 não afecta o desenvolvimento das Th2. Assim, a alta frequência de células Th1 em doentes hemodialisados pode ser explicada pelos altos níveis de IL-12, que facilita e aumenta a diferenciação das Th1 sem afectar o desenvolvimento das Th2. Tal é indicativo que a função auxiliar da activação das células B (Th2) encontra-se mais comprometida que a função efectora T (Th1) pela redução de activação de células T [Sester *et al*, 2000] (figura 1.4).

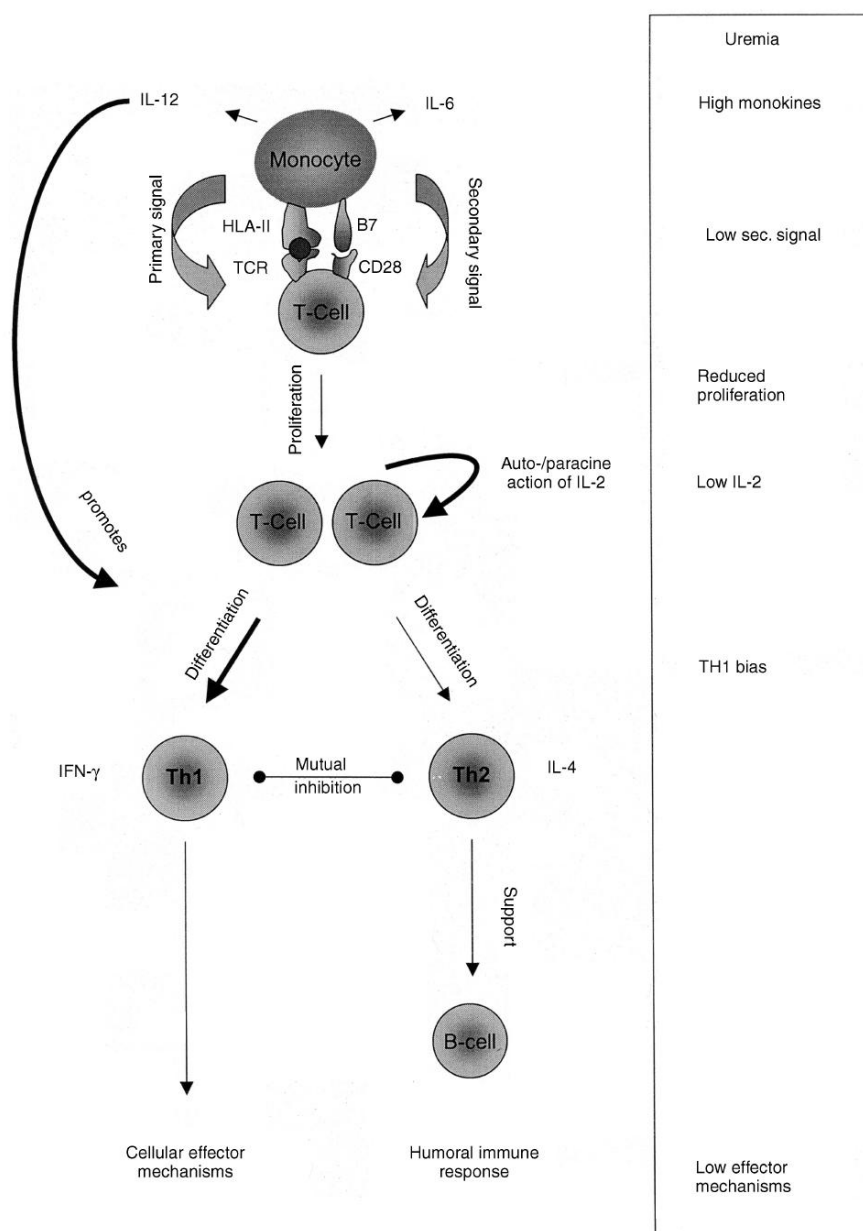


Figura 1.4: Alterações da função imunológica em doentes com falha renal crónica [Adaptado de Girndt *et al*, 2001]

As células T de doentes com doença renal crónica têm um imunofenótipo compatível com estimulação crónica de células T, demonstrado pelo aumento de percentagem das células T CD28-, CD57+, HLA-DR+, CD28-HLA-DR+, e CD57+HLA-DR+ [Costa *et al*, 2008]. Um aumento

nos marcadores de activação, HLA-DR e CD57 em ambas as células T CD4+ e CD8+ são compatíveis com um estado de activação contínuo em doentes com doença renal crónica [d'Angeac *et al*, 1997].

Na diabetes tipo 2, sem doença renal, a resistência à insulina leva a um aumento da secreção de insulina, mas em doentes com ESRD tal não acontece, devido à acidose metabólica, deficiência da 1,25 dihidroxivitamina D e hipertiroidismo secundário [Mak, 1992]. Em doentes que tenham ESRD e estejam em tratamento por hemodiálise, ocorre uma alteração da farmacocinética da medicação da diabetes, levando a um aumento dos níveis de glucose e um aumento do risco de episódios hipoglicémicos [Shrishrimal *et al*, 2009]. Os doentes diabéticos, quando comparados com indivíduos saudáveis, apresentam uma excessiva produção de citocinas Th1 acompanhado por uma deficiência de Th2 [Rapoport *et al*, 1998]. Este fenómeno está envolvido na patogénese da diabetes *mellitus* tipo 1 [Rabinovitch, 1994]. As células Th1 auxiliares e as suas citocinas são mais prevalentes em relação com às células de Th2, resultando numa cascata de processos imunológicos nos ilhéus pancreáticos, levando posteriormente à destruição das células B [Dietzmann *et al*, 2002].

Em doentes em hemodiálise, uma elevada percentagem de células T CD4+ activadas não proliferam e tornam-se apoptóticas [Meier *et al*, 2002; Ankersmit *et al*, 2001], sendo que a indução deste fenómeno é dependente da expressão de Fas/FasL (CD95) [Meier *et al*, 2003]. Doentes em hemodiálise, apresentam valores elevados nas células T CD4+ com um marcador de activação inicial (CD69+), mas apresentam valores baixos na resposta a proliferação, logo têm menos capacidade para proliferar. Neste tipo de doentes, os níveis de IL-2 encontram-se mais elevados quando comparados com os indivíduos saudáveis [Meier *et al*, 2007].

Antes do início de hemodiálise, o distúrbio urémico atinge o seu máximo. O tratamento de hemodiálise melhora muitos dos sinais e sintomas da urémia e é esperado que melhore a função imunológica celular, tal como a libertação de citocinas pró-inflamatórias. Alguns estudos conseguiram demonstrar isso mesmo, verificando-se um aumento significativo de APCs, com consequente aumento de proliferação de células T, após algumas semanas de tratamento [Kaul *et al*, 2000]. O número de monócitos diminui dramaticamente durante os primeiros 20 minutos de uma sessão de tratamento e só as células com baixo grau de activação e baixa produção de IL-6 é que permanecem em circulação [Girndt *et al*, 1997]. Outra característica que se verifica com a hemodiálise é o aumento das citocinas IFN- γ e IL-10, quando comparado com valores antes da hemodiálise. Isto é devido, possivelmente, à activação dos monócitos e dos linfócitos pelo contacto com a membrana do dialisador [Kamel *et al*, 2009].

Na tabela seguinte encontram-se alguns dos principais estudos feitos nesta área e as suas principais conclusões.

Tabela 1.2: Principais estudos das células envolvidas na imunidade de doentes com ESRD, DN e falha crónica renal que façam tratamento de diálise.

Referência	Doença	Nº doentes	Idade média	Células em estudo	Citocinas/moléculas em estudo	Principais resultados
Zamauskaite <i>et al</i> , 1999	ESRD	25 HD	52,1	Células Th1	IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10	Diminuição da percentagem relativa de células CD3 ⁺ que expressam IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10
		20 DP	57,9	Células Th2		
Kaul <i>et al</i> , 2000	Falha renal crónica e ESRD	14 Antes e depois algumas semanas de HD, onde 7 têm ND	59 \pm 14,2	Células T	CD28, IL-6, IL-10	Baixa percentagem relativa de células T antes de HD; aumento da percentagem relativa de células T após 6 semanas de HD
Sester <i>et al</i> , 2000	ESRD	20 HD	56,5 \pm 12,8	Células Th1 Células Th2	IL-2, IFN- γ e IL-12	Diminuição d expressão de IL-2, IFN- γ ; aumento da expressão de IL-12 e Th1
Girndt <i>et al</i> , 2001	Falha renal crónica	20 HD onde 5 têm ND	63,3 \pm 11	Monócitos	CD14, HLA-DR, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)	Diminuição da percentagem relativa de B7-2 em HD; valores normais de expressão de B7-1 e HLA-DR em HD; B7-1 expresso só em monócitos activados
		10 FRC sem diálise, onde 3 têm ND	71,1 \pm 10,3			
Dietzmann <i>et al</i> , 2002	ESRD/ND 2	30 HD	70 \pm 12	Células T	CD69, CD3	Diminuição da expressão CD69 em linfócitos T
Meier <i>et al</i> , 2002	ESRD	18 HD 8 ESRD	51 \pm 6	Células T	CD3, CD69, CD95, anexina V	Diminuição da percentagem relativa de células T em HD (comparando com grupo de ESRD e controlos); expressão elevada de CD69 em HD (em comparação com os outros grupos); aumento da apoptose das células T
Ando <i>et al</i> , 2005	Falha renal crónica	20 HD	55,5 \pm 2,3	Celulas T auxiliares Monócitos	TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-4, CD14, CD4	A HD potencia a síntese de TNF α pelos monócitos mas após HD não se altera; após HD também não se altera nem o IFN γ , IL-4 e IL-1 β ; aumento de Th1/Th2 e Th1 em HD; diminuição da síntese de IL-1 β e TNF α em PD e valores normais em HD
		20 DP	53,8 \pm 11			

Continuação da tabela 1.2

Referência	Doença	Nº doentes	Idade média	Células em estudo	Citocinas/moléculas em estudo	Principais resultados
Bradran <i>et al</i> , 2006	ESRD	25 HD não diabéticos	47,17	Células B	-	Diminuição da percentagem relativa de células B
		11 HD diabéticos				
Litjens <i>et al</i> , 2006	DRC	38 DRC	54±15	Células T Células B	CD4, CD8, CD3, CD45, CD14, CD19, CD45RO, CCR7, CXCR3, CCR5, CCR4, CD25 e CD27	Diminuição da percentagem relativa de células B em doentes com DRC estágio 5, em relação ao grupo controlo; predominância da produção de citocinas tipo 1 em doentes em HD; aumento da expressão de CD25 em células CD4 ⁺
Yoon <i>et al</i> , 2006	ESRD	21 HD (antes e depois HD)	49±3,4	Células T	CD4, CD8, CD45RA, CCR7	Percentagem relativa de células T CD4 ⁺ e CD4/CD8 reduzida no grupo de ESRD; Diminuição da percentagem relativa de células T CD8 ⁺ após a HD
Meier <i>et al</i> , 2007	ESRD	15 HD	51±5	Células T	CD3, CD4, CD69, CD95, IL-2	Diminuição da expressão de CD69 em células TCD4 em HD (comparando com os outros grupos); diminuição da expressão de IL-2 em células CD69 ⁺ CD4 ⁺ na presença de ox-LDL e de Bcl-2; aumento de Bax
		15 DP	52±7			
		15 DRC	50±4			
Costa <i>et al</i> , 2008	ESRD	50 HD em que 16 têm ND	-	Células T Células B Monócitos Neutrófilos Eosinófilos	CD3, CD4, CD8, CD57, HLA-DR, CD28, sIL2R, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFα e IFNγ	Diminuição da percentagem relativa de linfócitos T e linfócitos T CD4 ⁺ ; aumento da expressão de IL-2, TNFα, IFNγ, IL-6, sIL2R nas subpopulações das células T, e na percentagem relativa de células T CD28 ⁻ , CD57 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD28 ⁻ HLA-DR ⁺ e CD57 ⁺ HLA-DR ⁺
Hendriks <i>et al</i> , 2009	ESRD	40 HD	27±13	Células T CD4 ⁺	CD3, CD4, CD19, CD8, CD45, CD14, CD25, CD16CD56	Percentagem relativa de CD19, CD3-CD16+CD56 ⁺ , CD4, CD3 e CD4+CD25bright ⁺ mais baixa em doentes ESRD, em comparação com os controlos
		26 PD	19±9			

Continuação da tabela 1.2

Referência	Doença	Nº doentes	Idade média	Células em estudo	Citocinas/moléculas em estudo	Principais resultados
Kamel <i>et al</i> , 2009	DN tipo 2 e ESRD	17 Diabéticos sem alterações nos rins	47,9±8,9	Células CD4+	sICAM-1, IFN-γ, IL-10 e sE-selectin	Aumento da síntese de IFN-γ e IL-10 em DN e ESRD, e sICAM-1 e sE-selectin em diabéticos, DN e ESRD; após HD a síntese de sICAM-1, IFN-γ e IL-10 aumentam
		22 ND (diabéticos tipo 2 com alterações nos rins)	55,9±9,3			
		19 ESRD (diabéticos tipo 2 com ESRD em HD)	52,8±8,8			
Vrabie <i>et al</i> , 2009	Falha renal crónica	15 HD (antes e após HD)	31-50	Células T Células B Células NK Monócitos Granulócitos	CD3, CD19, CD16/CD56, CD45, CD4, CD8, CD25, HLA-DR	Diminuição da percentagem relativa de células B e CD8+ após HD; aumento da percentagem relativa de células T CD4+ e NK e linfócitos T com receptor para a IL-2 após HD; não houve alteração na razão CD4/CD8 após HD
Borges <i>et al</i> , 2011	ESRD	47 HD (12 antes HD e depois HD)	65,58±16,99	Células T CD4+	CD3, CD4, Annexina V e 7-AAD	Diminuição da percentagem relativa de células T CD4+ em doentes HD, comparando com os controlos; aumento da percentagem relativa de células T apoptóticas CD4+, comparando antes e depois da HD

Abreviaturas: ESRD: Doença renal em fase terminal; ND: Nefropatia diabética; HD: Hemodiálise; DP: Diálise peritoneal; IFN-γ: Interferão gama; TNF-α: Factor de necrose tumoral alfa; DRC: Doença renal crónica; FRC: Falha renal crónica

Através de uma análise feita aos estudos realizados nesta área verificou-se que existe uma escassa informação acerca do comportamento da expressão de marcadores de activação em células T e suas sub-populações (CD4 e CD8), após uma única sessão de hemodiálise, bem como estudos focados no perfil citocínico inflamatório em amostras de sangue, colhidas antes e após a hemodiálise. Assim sendo, este estudo tem como principais objectivos:

- Comparar as percentagens relativas de células T, células T CD4 e células T CD8, antes e após a sessão de hemodiálise;
- Estudar por citometria de fluxo a expressão dos marcadores de activação CD25, CD69 e CD71, em células T, células T CD4 e células TCD8, bem como comparar estes valores antes e após a hemodiálise;
- Estudar a apoptose celular, através da conjugação anexina V/iodeto de propídeo, antes e após a hemodiálise;
- Avaliar a secreção das citocinas, IL-8, IL-18, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, no soro, e comparar os valores antes e após a hemodiálise.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

1- Selecção da amostra

A amostra do estudo foi seleccionada de entre doentes que fazem hemodiálise no centro de diálise *Nephrocare* - Covilhã, sendo que as características comuns foram: ter diabetes *mellitus* tipo II, o tipo de acesso vascular ser por fístula arteriovenosa e não terem efectuado nenhum transplante. Os critérios de exclusão basearam-se em factores que podem afectar o Sistema Imunológico: serem fumadores e tomarem medicamentos anti-asmáticos e antibióticos. Assim sendo, a nossa amostra consistiu num grupo de 17 doentes (7 Homens e 10 Mulheres) com uma média de idades de $72.4 \pm 10,2$, sendo que 88.2% são insulino-dependentes, Todos os doentes realizam hemodiálise há mais de um ano. As características laboratoriais referentes às análises feitas mais próximas do dia de colheita estão resumidas na tabela 2.1. Todos os participantes foram informados dos objectivos do estudo e assinaram um consentimento informado, submetido e aprovado pela comissão de ética da *Fresenius Medical Care*.

Tabela 2.1: Características clínicas e laboratoriais da população em estudo

ID	Creatinina (mg/dL)	Proteína C reactiva (mg/L)	PTH (pg/mL)	Transferrina (mg/dL)	HbA1c (%)	Glicémia (mg/dL)	Dosagem de Eritropoietina (µg/mês)	eKt/V
Voluntário 1	8,96	6	55,39	156	7,6	155,8	40	1,67
Voluntário 2	8,45	4,2	133,3	216	7,4	95,8	80	1,79
Voluntário 3	5,17	4,6	88,44	163	7,6	129,5	80	1,80
Voluntário 4	7,41	3,8	175,9	167	9,1	164,4	40	1,84
Voluntário 5	5,71	3,4	40,11	312	8,5	263,9	Sem dados	2,14
Voluntário 6	7,42	11,2	329	178	7	67,8	40	1,71
Voluntário 7	7,52	1	176,9	136	5,8	47,9	80	1,68
Voluntário 8	8,15	8,1	336,1	139	5,7	183,7	120	1,69
Voluntário 9	7,34	5,5	224,6	154	8,9	109,1	80	1,75
Voluntário 10	7,07	4,8	424,1	153	7,4	202,5	80	2,17
Voluntário 11	8,03	17,3	414,5	182	9	220,6	40	2,46
Voluntário 12	5,14	2,6	228	224	9	163,8	40	1,57
Voluntário 13	4,14	64	220,6	118	7	265,2	160	1,10
Voluntário 14	7,01	3,6	264,7	123	6,5	192,1	40	2,20
Voluntário 15	5,55	2,9	42,29	180	6,5	171,9	80	1,94
Voluntário 16	7,61	10,4	276	165	8	182,1	Sem dados	1,33
Voluntário 17	5,56	5,8	265,6	159	8,4	255,2	80	1,83

2- Análise dos marcadores de activação por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de contagem e análise celular, que tem a capacidade de determinar parâmetros celulares, sejam eles morfológicos ou fenotípicos. Esta técnica é realizada após a incubação das amostras com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, que se ligam a componentes celulares específicos, e que posteriormente emitem fluorescência. O citómetro de fluxo é um instrumento especializado que é capaz de detectar esta fluorescência em células individuais numa suspensão, e posteriormente determinar o número de células que expressam as moléculas. É uma técnica que é normalmente usada para a análise de linhagens celulares, estágios de maturação e estado de activação, com o uso de fluorocromos ligados a anticorpos, bem como do tamanho e complexidade celular, sem o uso de fluorocromos. Esta técnica também permite a análise de diferentes parâmetros, com a marcação com diferentes anticorpos (o número de parâmetros depende do citómetro), permitindo a análise da heterogeneidade numa amostra.

A colheita de sangue foi efectuada no centro de diálise, em simultâneo com as colheitas de rotina, antes e após a sessão de hemodiálise, em tubos com anticoagulante EDTA. Do sangue colhido, 100µL foram usados em cada ensaio, para a análise de linfócitos por citometria de fluxo, num citómetro de fluxo FACS Calibur® (*Becton Dickinson*), equipado com dois lasers, um de Árgon e granulosidade e quatro fluorescências de cores diferentes).

O sangue foi incubado com os anticorpos durante 15 minutos, em gelo e no escuro. Para cada amostra prepararam-se quatro tubos diferentes: o controlo negativo (tubo 0), que em vez do anticorpo continha 50 µL de *staining buffer* (PBS 1x contendo 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de azida de sódio (NaN₃)); e três tubos (tubo 1 a 3) com combinações diferentes de marcadores de activação como descrito na tabela 2.3.

Tabela 2.2: Anticorpos utilizados nas experiências de citometria de fluxo

Anticorpo	Clone	Isotipo	Fluorescência	Referência	Fabricante
Anti-CD3	UCHT1	Mouse IgG1, k	APC	#555335	BD Pharmingen™
Anti-CD4	RPA-T4	IgG1, k	FITC	#555346	BD Pharmingen™
Anti-CD8	BW135/80	Mouse IgG2a	PerCP	#130-094-972	Miltenyl Biotec
Anti-CD25	M-A251	IgG1, k	PE	#555432	BD Pharmingen™
Anti-CD69	FN50	IgG1, k	PE	#555531	BD Pharmingen™
Anti-CD71	M-A712	IgG2a, k	PE	#555537	BD Pharmingen™

Abreviaturas: APC, allophycocyanin; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; PerCP, Peridinin-chlorophyll-protein complex; PE, Phycoerythrin

Tabela 2.3: Combinação dos anticorpos e quantidade usada para a análise da população de linfócitos por citometria de fluxo

Tubo	CD3 (μL)	CD4 (μL)	CD8 (μL)	CD25 (μL)	CD69 (μL)	CD71 (μL)
1	17	17	8	17	-	-
2	17	17	8	-	17	-
3	17	17	8	-	-	17

Após incubação, procedeu-se à lise das células com 1mL de solução *BD FACS Lysing* (1x concentrado), durante 15 minutos no escuro. Para a separação dos leucócitos totais do sangue dos restantes constituintes celulares, centrifugou-se as amostras a 1200rpm durante 4 minutos. Após desprezar o sobrenadante, procedeu-se à lavagem (1 a 2 vezes) do *pellet*, para retirar o maior número de eritrócitos lisados, com 500 μL de *Binding buffer* (PBS: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄ - pH7,4), seguido de nova centrifugação a 1200rpm durante 4 minutos. Uma vez isolados os leucócitos foram ressuspensos em 400 μL de PBS e colocados no escuro e no gelo, até à aquisição.

A análise dos resultados foi feita com recurso ao software CELLquest®, onde o sistema foi definido para a avaliação de 15000 células, numa região delimitada à região com as características morfológicas dos linfócitos (figura 2.1).

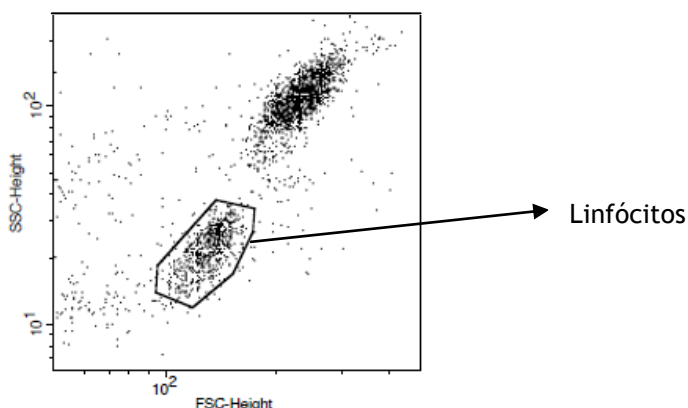


Figura 2.1: Gráfico “Dot Plot” tamanho (FSC) vs complexidade (SSC)

Após a definição desta região e através da amostra do controlo negativo (sem anticorpo), definiu-se uma região para as células T, presentes na região dos linfócitos, com a construção de um gráfico “Dot blot” complexidade (SSC) versus CD3, como exemplificado na figura 2.2.

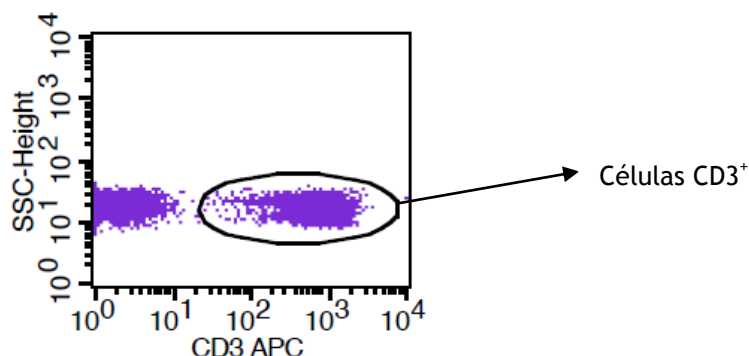


Figura 2.2: Gráfico “Dot Plot” CD3 vs complexidade (SSC)

Através da amostra do controlo negativo foram também construídos histogramas relativos ao número de células que expressavam cada uma das quatro fluorescências, na região dos linfócitos, servindo para delimitar as regiões positivas (M1) para cada uma das quatro fluorescências (Figura 2.3).

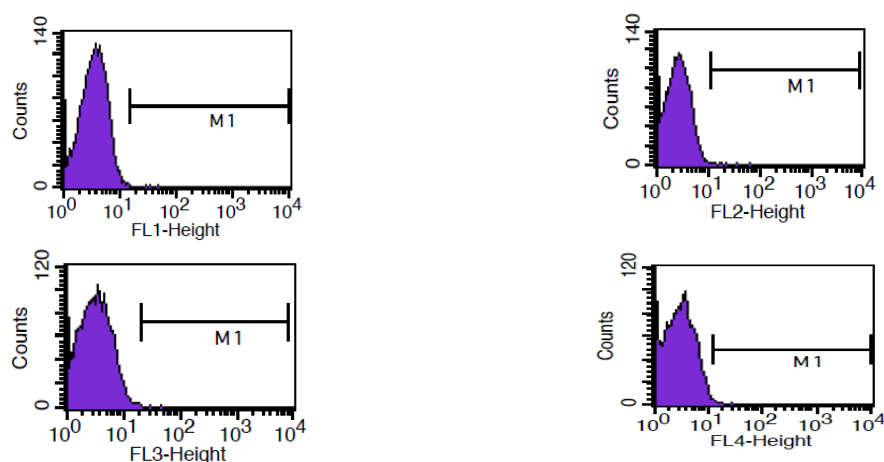


Figura 2.3: Histogramas representativos da selecção da região positiva, em amostras dos controlos negativos.

Para cada amostra foram também construídos: a) histogramas representativos da percentagem relativa de células $CD3^+$ na região dos linfócitos, b) gráficos “dot blot” $CD8$ versus $CD4$, resultante do cruzamento entre a região dos linfócitos e a região das células T, para determinar a percentagem relativa de células $CD4^+$ e $CD8^+$, c) histogramas relativos à percentagem de células que expressavam $CD25$, $CD69$ e $CD71$, em três diferentes regiões, resultante do cruzamento entre: região dos linfócitos com as células $CD3^+$; a região dos linfócitos, a região das células $CD3^+$ e a região das células $CD4^+$; e a região dos linfócitos, a região das células $CD3^+$ e a região das células $CD8^+$ (Figura 2.4).

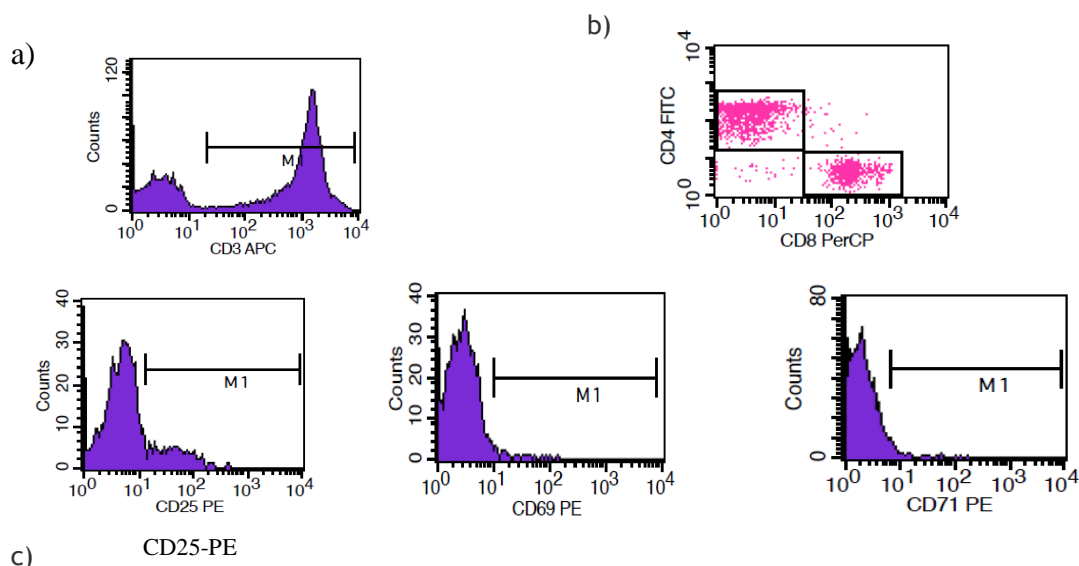


Figura 2.4: Gráficos representativos da metodologia usada para a determinação da percentagem relativa de células T (a), T CD4 (b), T CD8 (b) e expressão de CD25 (c), CD69 (c) e CD71 (c) nas subpopulações de células T. Nota: No histograma c) só está representado uma das 3 regiões resultantes de cruzamento.

3- Análise da apoptose celular por citometria de fluxo

A apoptose celular pode ser avaliada pela marcação com anexina V, pois esta é uma proteína de ligação a fosfolípidos, nomeadamente a fosfatidilserina, expressa na superfície das células durante uma fase inicial de apoptose.

Após obtenção do *pellet* este foi ressuspensão em 500 µL de *annexin binding buffer* (0,1 M Hepes/NaOH, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂ - pH7,4) e posteriormente centrifugado a 1200rpm durante 4 minutos. Após desprezo do sobrenadante adicionou-se 100 µL de *annexin binding buffer* com 5 µL de anexina V (FITC, Ref. #556420, BD Pharmingen™). Após 15 minutos de incubação no escuro adicionou-se mais 300 µL de *annexin binding buffer*. Para uma melhor diferenciação da apoptose em fase inicial adicionou-se 5 µL de iodeto de propídio (stock com concentração de 50 µg/mL), pois intercala-se com a dupla hélice da cadeia de DNA, minutos antes da análise por citometria de fluxo.

Para a análise de percentagem relativa de células apoptóticas, construíram-se histogramas das amostras antes e após a hemodiálise, na região correspondente aos linfócitos.

4- Análise de citocinas

Para a avaliação das citocinas utilizou-se o kit “Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines” (BD Pharmingen™, 551811). As amostras de sangue foram colhidas antes e após a hemodiálise, para tubos sem anticoagulante, tendo sido, posteriormente isolado o soro por centrifugação, a 4000rpm durante 10 minutos, a uma temperatura de 20°C.

Estas amostras de soro foram congeladas em tubos de criopreservação antes de se proceder à sua avaliação por citometria de fluxo.

O kit “BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines” foi usado para medir quantitativamente os níveis de proteína das citocinas inflamatórias IL-8, IL-18, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, numa única amostra de soro. Este kit consiste num método de captura de analito solúvel ou de um conjunto de analitos com esferas de tamanho e fluorescência conhecidos, fazendo com que seja possível detectar os analitos usando a citometria de fluxo. Para tal, temos de proceder primeiro à preparação dos padrões para a formação da curva de calibração. Preparou-se um tubo com as esferas padrão e *assay diluent* do kit, num volume total de 2mL, para um tubo denominado “top Standard”. A partir deste tubo procedeu-se a 8 diluições como exemplificado na figura 2.5. Preparou-se também um tubo para controlo negativo que continha só *assay diluent*.

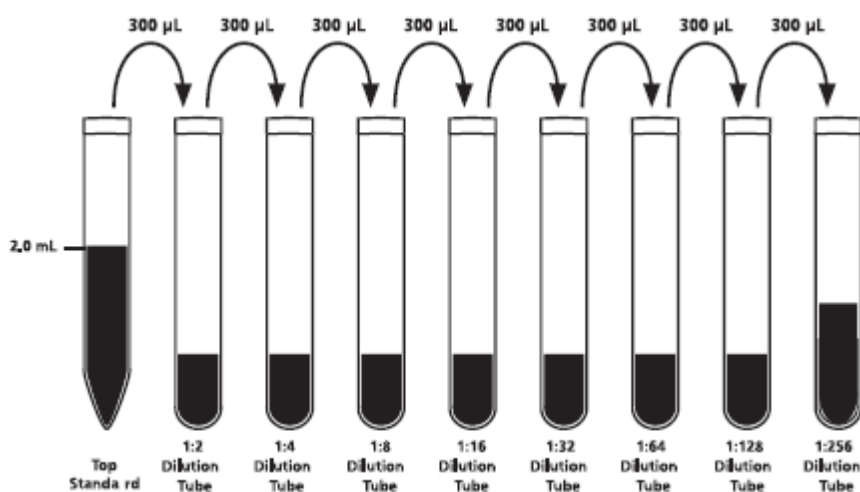


Figura 2.5: Diluições efectuadas para a formação da curva de calibração.

De seguida preparou-se uma solução com 10µL de cada *capture beads* num volume total de 440 µL, correspondente ao número de tubos a analisar (padrões, controlo negativo e amostras). Centrifugou-se a mistura das *beads* a 200g durante 5min, descartando o sobrenadante com uma pipeta, e ressuspendendo, de seguida, o *pellet* em *serum enhancement buffer*, num volume igual ao retirado de sobrenadante. Esta mistura das *capture beads*, após ser agitada em vortex, foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

Após a incubação da mistura das *capture beads* adicionou-se 50 µL a todos os tubos das amostras, adicionando aos tubos de controlo, resumidos na tabela 2.4, 50 µL de *human inflammatory cytokine standard dilutions*.

Tabela 2.4: Concentração e respectivas diluições dos tubos de controlo

Tubo	Concentração (pg/mL)	Diluição dos padrões
1	0 (controlo negativo)	Sem diluição (só com <i>assay diluent</i>)
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312,5	1:16
7	625	1:8
8	1250	1:4
9	2500	1:2
10	5000	<i>Top standard</i>

Adicionou-se 50 µL de cada amostra desconhecida aos seus respectivos tubos, previamente rotulados, e incubou-se todos os tubos durante 1 hora e meia à temperatura ambiente e ausente de luz.

Após incubação adicionou-se 1mL de *wash buffer* a cada tubo a analisar e centrifugou-se a 200g durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante, cuidadosamente, deixando aproximadamente 100 µL, tendo-se adicionado de seguida 50 µL de *human inflammatory cytokine PE detection reagent* a todos os tubos, ressuspensando o *pellet* devagarinho. Após uma incubação de 1 hora e meia, às escuras, adicionou-se aos tubos 1mL de *wash buffer*, centrifugando-se de seguida a 200g durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, com cuidado, e ressuspendeu-se o *pellet* em 300 µL de *wash buffer*. As amostras permaneceram no escuro até à sua análise por citometria de fluxo.

A análise dos resultados foi efectuada através do software CELLquest® e a realização dos cálculos, num ficheiro Excell disponibilizado pela *Becton Dickinson* (BD).

5- Análise estatística

Para a comparação da percentagem relativa de células CD3, CD4, CD8, dos marcadores de activação CD25, CD69 e CD71, nas subpopulações de células T e das citocinas IL-8, IL-18, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, antes e após a hemodiálise utilizou-se o *Wilcoxon Signed-Rank test*, usando o software SPSS (versão 19), tendo sido considerados significativos valores com $p < 0,05$. Este teste permite detectar diferenças significativas entre os valores centrais de duas situações, quando se consideram os mesmos sujeitos. Representa a alternativa não paramétrica ao teste *t-student* para amostras emparelhadas, quando não se encontram reunidas as condições de aplicação de um teste paramétrico.

Capítulo 3

Resultados

1 - Análise dos marcadores de activação em células T

Após o isolamento dos leucócitos em amostras de sangue total, foi avaliada por citometria de fluxo a percentagem relativa de células T, células TCD4 e TCD8 e da razão CD4/CD8. Observou-se um aumento de 10% relativamente à percentagem de células CD3CD4 antes e após a hemodiálise, $61,5 \pm 12$ vs $68,1 \pm 11$ ($p < 0,05$). No entanto, a percentagem relativa de células CD3CD8 depois da sessão de hemodiálise diminuiu 17% ($32,6 \pm 10,6$ vs $27,2 \pm 9,4$, $p < 0,05$). Como consequência observou-se um aumento significativo de 40% da razão CD4/CD8 depois da sessão da hemodiálise ($2,2 \pm 1,2$ vs $3,1 \pm 2,1$, $p < 0,05$). Relativamente à comparação da percentagem relativa de células positivas CD3, antes e após a hemodiálise observou-se um aumento de 3 % mas este resultado não se verificou ser estatisticamente significativo (Tabela 3.1 e Gráfico 3.1).

Tabela 3.1: Valores de média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos das percentagens relativas das células T, suas sub-populações (CD4 e CD8) e razão CD4/CD8, antes e após hemodiálise

	Pré diálise		Pós diálise		P	
	M±DP	Med (min-máx)	M±DP	Med (min-máx)		
Células T	CD3+	61,8±12,4	59,4 (30,6-81,8)	63,6±10,8	64,5 (35-78,5)	0,122
	CD4+	61,5±12	62,3 (43,8-81,2)	68,1±11	68,1 (53-89)	<0,0001
	CD8+	32,6±10,6	33,5 (15,5-49,7)	27,2±9,4	28,7 (9,2-40,8)	<0,0001
	CD4/CD8	2,2±1,2	1,9 (0,9-5,2)	3,1±2,1	2,4 (1,3-9,6)	<0,0001

Abreviaturas: M±DP, média±desvio-padrão; Med (min-máx), mediana (mínimo-máximo)

Valor de p calculado pelo Wilcoxon Signed-Rank test

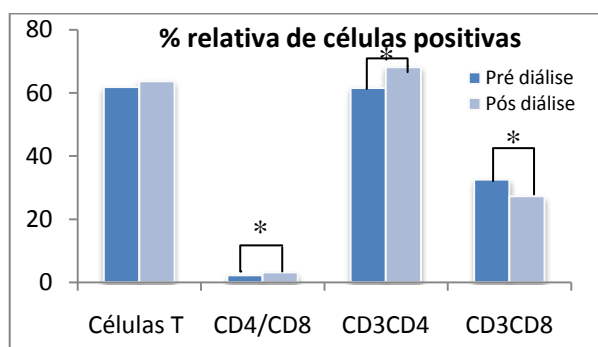


Gráfico 3.1: Percentagens relativas das células T, suas sub-populações (CD4 e CD8) e razão CD4/CD8, antes e após hemodiálise, em 17 doentes diabéticos hemodialisados (* $p < 0,05$)

Por citometria de fluxo foi também analisado o efeito da HD na expressão de três marcadores de activação, CD25, CD69 e CD71, nos linfócitos T globalmente e nas duas principais sub-populações, T CD4 e T CD8. Verificaram-se diferenças significativas na percentagem relativa de células T CD25 ($31,6 \pm 14,9$ vs $36,2 \pm 12,7$, $p < 0,05$), nas células T CD8 CD25 ($6,9 \pm 4,5$ vs $9,1 \pm 6$, $p < 0,05$), em que se verifica um aumento de 15% e 32%, respectivamente, após sessão de hemodiálise, e em células T CD69 ($10,6 \pm 7,1$ vs $7,8 \pm 4,2$, $p < 0,05$), onde se verifica uma diminuição da percentagem relativa de 26%, após sessão de hemodiálise. Para os restantes marcadores de activação expressos nas células T, T CD4 e T CD8 não se verificaram diferenças significativas (Tabela 3.2 e Gráfico 3.2).

Tabela 3.2: Valores de média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos das percentagens relativas da expressão de CD25, CD69 e CD71 em células T e suas sub-populações (CD4 e CD8), antes e após hemodiálise

		Pré diálise		Pós diálise		p
		M±DP	Med (min-máx)	M±DP	Med (min-máx)	
CD25	CD3+	31,6±14,9	33,7 (4,3-58,2)	36,2±12,7	34,3 (11,5-64,1)	0,013
	CD4+	45,1±17,1	47,2 (6,4-69,9)	47,9±13,5	45,6 (15,3-71,3)	0,176
	CD8+	6,9±4,4	6,7 (1-15,4)	9,1±6	6,9 (1,1-25,4)	0,002
CD69	CD3+	10,6±7,1	9 (0,4-30,2)	7,8±4,2	6,4 (1,1-14,7)	0,022
	CD4+	11,3±12,4	7,1 (0,1-49,3)	7,9±5,2	6,8 (1,7-17)	0,112
	CD8+	8,7±3,9	8,9 (0,7-14,4)	8±3,9	7,8 (2,2-15,7)	0,115
CD71	CD3+	4,6±6,3	2,2 (0,1-24,7)	4,1±4	3 (0,4-14,6)	0,455
	CD4+	7,2±10,6	2,8 (0,1-41,3)	5,3±5	3,5 (0,5-15,3)	0,416
	CD8+	0,8±0,6	0,7 (0-2,4)	1,5±3,3	0,5 (0,1-13,6)	0,337

Abreviaturas: M±DP, média±desvio-padrão; Med (min-máx), mediana (mínimo-máximo)
Valor de p calculado pelo Wilcoxon Signed-Rank test

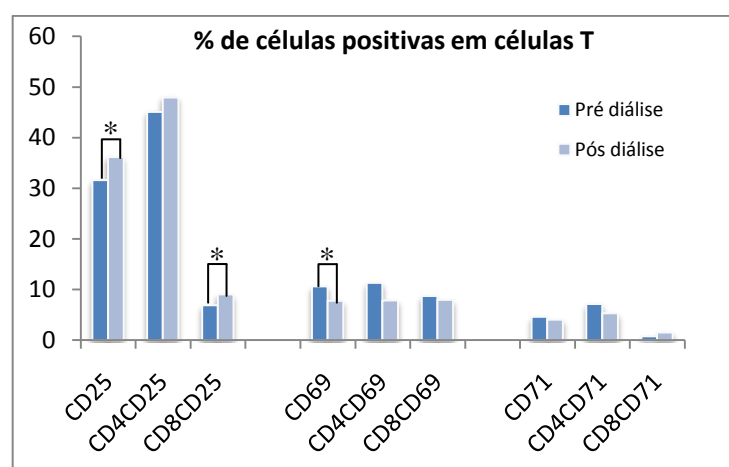


Gráfico 3.2: Percentagens relativas da expressão dos marcadores CD25, CD69 e CD71 em células T e suas sub-populações (CD4 e CD8), antes e após hemodiálise, em 17 doentes diabéticos hemodialisados (* $p < 0,05$)

Posteriormente, foi feita uma análise semelhante aos marcadores de activação expressos nas sub-populações de células analisadas para os valores de intensidade de fluorescência, tendo-se verificado as seguintes diferenças significativas, após sessão de hemodiálise: diminuição de 11% da percentagem relativa de células T CD4 que expressavam CD25 ($56,4 \pm 20$ vs $50,4 \pm 17,2$, $p < 0,05$), de 39% nas células T CD71 ($34,3 \pm 21,1$ vs $21 \pm 9,7$, $p < 0,05$), de 32% de células T CD4 CD71 (30 ± 16 vs $20,4 \pm 10,6$, $p < 0,05$), e 42% de células T CD8 CD71 ($39,4 \pm 30,9$ vs $23 \pm 12,6$, $p < 0,05$). Para as outras células que expressaram os marcadores de activação CD25, CD69 e CD71 não se encontraram diferenças significativas (Tabela 3.3 e Gráfico 3.3).

Tabela 3.3: Valores da média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos da *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) das células T e suas sub-populações (CD4 e CD8) que expressam os marcadores CD25, CD69 e CD71, antes e após hemodiálise

		Pré diálise		Pós diálise		p
		M \pm DP	Med (min-máx)	M \pm DP	Med (min-máx)	
CD25	CD3+	55,7 \pm 19,4	59 (22,7-86,6)	49,9 \pm 16,9	52,2 (23,5-71,4)	0,054
	CD4+	56,4 \pm 20	62,5 (23,8-88,1)	50,4 \pm 17,2	55,3 (23-71,6)	0,037
	CD8+	34,5 \pm 11,2	36,6 (16,3-58,4)	32 \pm 9,9	31,3 (16,4-44,7)	0,119
CD69	CD3+	45,7 \pm 23,9	42,6 (15,7-99)	41,1 \pm 25	36,6 (12-100,9)	0,259
	CD4+	28,8 \pm 14,6	27,5 (12,9-61,4)	26,6 \pm 13,6	23,4 (9-54,3)	0,085
	CD8+	61,3 \pm 25,5	57,7 (25,1-110,6)	59,6 \pm 27,2	54,5 (27,1-98,2)	0,259
CD71	CD3+	34,3 \pm 21,1	25,5 (10,9-84)	21 \pm 9,7	18,6 (6,6-49)	0,022
	CD4+	30 \pm 16	25,4 (10,9-59,3)	20,4 \pm 10,6	18,2 (6,5-54,9)	0,012
	CD8+	39,4 \pm 30,9	27,8 (0-120,8)	23 \pm 12,6	21,4 (5,8-59,8)	0,03

Abreviaturas: M \pm DP, média \pm desvio-padrão; Med (min-máx), mediana (mínimo-máximo)
Valor de p calculado pelo *Wilcoxon Signed-Rank test*

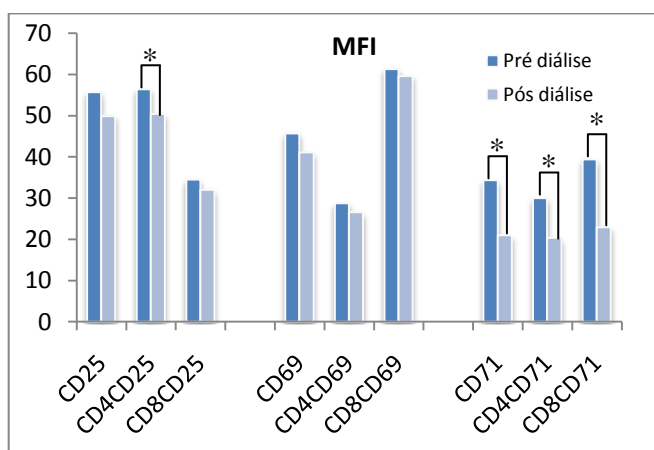


Gráfico 3.3: Valores da *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) das células T e suas sub-populações (CD4 e CD8) que expressam os marcadores de activação CD25, CD69 e CD71, antes e após hemodiálise, em 17 doentes diabéticos hemodialisados (* $p < 0,05$)

Para a análise da apoptose celular em linfócitos, também se usou a citometria de fluxo, mas estes resultados foram inconclusivos, sendo necessária a realização de mais estudos posteriormente.

2 - Análise de citocinas

Para a análise da concentração serológica de citocinas inflamatórias, usou-se o *Cytometric Bead Array*, que tem por base a citometria de fluxo e obtiveram-se diferenças significativas em três das citocinas estudadas: na IL-10 ($2,1 \pm 0,7$ pg/mL vs $2,5 \pm 0,7$ pg/mL, $p < 0,05$), e na IL-6 ($8,9 \pm 5,6$ pg/mL vs $11,6 \pm 7,8$ pg/mL, $p < 0,05$), onde se verificou um aumento da concentração de 5% e 19%, respectivamente, após a sessão de hemodiálise, e na IL-8 ($17,4 \pm 6$ pg/mL vs $11,1 \pm 3,7$ pg/mL, $p < 0,05$), com uma diminuição da concentração de 22%, após hemodiálise. Nas outras citocinas avaliadas, para além de não se ter verificado diferenças significativas, verificou-se que em algumas amostras, o cálculo da concentração das citocinas se encontrava abaixo do limite de detecção, tendo em conta a curva de calibração realizada no início do procedimento (Tabela 3.4 e Gráfico 3.4).

Tabela 3.4: Valores de média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos da concentração das citocinas IL-8, IL-1B, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, antes e após hemodiálise (n=15)

	Pré diálise		Pós diálise		P
	M \pm DP	Med (min-máx)	M \pm DP	Med (min-máx)	
IL12p70	5,5 \pm 0,4	1,8 (1,7-2,8)	5,5 \pm 0,5	2 (1,6-2,7)	-
TNF- α	5,6 \pm 0,5	1,8 (1,1-2,2)	5,5 \pm 0,5	1,6 (1,1-1,9)	-
IL-10	6,6 \pm 0,6	2,1 (1,4-3,8)	6,9 \pm 0,8	2,4 (1,6-4,2)	0,001
IL-6	14,6 \pm 5,8	6,7 (2,4-24,9)	17,4 \pm 7,9	7,9 (3,3-31,4)	0,005
IL-1B	7,4 \pm 0,4	1,3 (1,2-1,8)	7,3 \pm 0,5	1,5 (1,4-1,5)	-
IL-8	22,8 \pm 4,8	18 (9,1-26,9)	17,8 \pm 3	10,3 (5,8-20,2)	<0,0001

Abreviaturas: M \pm DP, média \pm desvio-padrão; Med (min-máx), mediana (mínimo-máximo)
Valores de p calculado pelo *Wilcoxon Signed-Rank test*

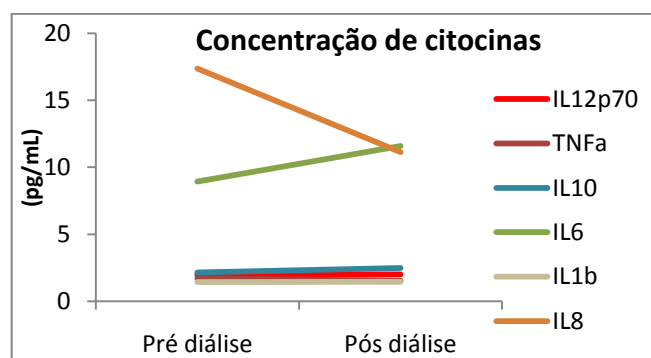


Gráfico 3.4: Valores de concentração das citocinas inflamatórias IL-8, IL-1B, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, antes e após a sessão de hemodiálise, expressos em pg/mL

Capítulo 4

Discussão

A diálise leva a algumas alterações no Sistema Imunológico, como por exemplo na activação do complemento, na função dos macrófagos [Vrabie *et al*, 2009], na activação de células T [Meier *et al*, 2002] e na libertação de várias citocinas pró-inflamatórias [Zamouskaite *et al*, 1999]. No presente estudo propusemo-nos a analisar mais profundamente alguns aspectos associados à activação de linfócitos T, incluindo a síntese de citocinas inflamatórias. Inúmeros estudos incidiram sobre a comparação entre voluntários saudáveis e hemodialisados nestes parâmetros mas, poucos existem com foco nas alterações que ocorrem após uma sessão de hemodiálise.

Associada à terapia renal, alguns autores [Fernandez-Fresnedo *et al*, 2000; Kurz *et al*, 1986] reportaram uma linfopénia nas células T, no entanto, no nosso estudo, ao analisarmos os valores de percentagem relativa de células T após uma sessão de hemodiálise, não se verificam diferenças significativas, verificando-se assim que a HD não provoca alterações na percentagem destas células. Contudo, na análise das subpopulações destas células verificaram-se alterações. Relativamente à percentagem relativa de células T CD4 verificou-se um aumento de 10%, após sessão de hemodiálise, da percentagem de células positivas CD4, não sendo estes resultados concordantes com outros autores, como Yoon e seus colegas, em que não verificaram alterações nesta percentagem celular. No entanto o estudo destes investigadores continha uma população de 21 doentes em hemodiálise, enquanto no nosso estudo analisámos 17 amostras. Contudo, este aumento de percentagem de células T CD4 pode ser devido à própria duração do procedimento de HD (duração média de 4h), em que se promove um estado contínuo de activação nas células T, como sugerido por Borges e colegas. Quanto à percentagem relativa de células T CD8, verificámos uma diminuição da percentagem relativa de 17%, após sessão de hemodiálise, estando os nossos resultados de acordo com estudos prévios, [Yoon *et al*, 2006]. Uma das possíveis explicações está relacionada com as possíveis consequências do contacto do sangue com a membrana do dialisador, e se este contacto pode levar à apoptose celular destas células. No entanto, esta diminuição da percentagem relativa de células T CD8 necessita da realização de mais estudos para uma melhor compreensão do porquê da diminuição destas células, após a sessão de HD. Os nossos estudos foram também concordantes com outros autores em relação ao valor da razão CD4/CD8, verificando-se uma diminuição deste valor após sessão de HD.

Devido à importância das células T na resposta imunológica, investigou-se o estado de activação destas células através da análise da expressão de diferentes marcadores de superfície. Os resultados mostraram um aumento da activação das células T e T CD8 medido pela expressão do CD25 de 15% e 32%, respectivamente, após a sessão de HD. Tal facto pode ser justificado pelo contínuo estado de activação, devido ao contacto com a membrana do dialisador, durante a sessão de HD. Uma das possíveis consequências do aumento da expressão desta molécula nas células T é um aumento da proliferação celular, pois a CD25 é a cadeia α do receptor para a IL-2. Após estimulação do linfócito, a IL-2 actua como factor de crescimento celular nos linfócitos, promovendo posteriormente a proliferação linfocitária. Verifica-se também, pelo valor da percentagem do aumento, que as células T CD8 se encontram mais susceptíveis a activação, em relação às células T CD4. No entanto relativamente à expressão do marcador de activação CD69, verifica-se uma diminuição da expressão de 26% nas células T, após sessão de HD. Este marcador está associado à divisão celular [Meier *et al*, 2002], o que parece sugerir que a HD não promove a proliferação celular dos linfócitos T. A activação de células T induzida por antígeno é conhecida por resultar na expressão de marcadores de activação numa sequência ordenada: CD69, CD25, CD71 e HLA-DR [Caruso *et al*, 1997]. Como as nossas amostras foram analisadas num intervalo de 1 hora a 12 horas, após a colheita, e o CD69 é expresso minutos após activação, este pode ser um motivo desta diminuição de percentagem, relativamente à expressão de CD25, que é expresso de minutos a horas após activação. De facto, consideramos que esta diferença de tempo entre a colheita das amostras de sangue e a análise foi uma limitação do estudo, e que futuras experiências têm que ser feitas no sentido de perceber se esta limitação pode ter ou não influência nos resultados de imunofenotipagem. As consequências da diminuição da expressão deste marcador estão relacionadas com a diminuição da síntese de citocinas, a diminuição do influxo de cálcio e a diminuição da citotoxicidade mediada por células NK.

Além dos valores de percentagem de células positivas, foram também comparados, antes e após HD, os valores de MFI (*Mean Fluorescence Intensity*). Este parâmetro avalia a intensidade de fluorescência das células, que é proporcional à densidade celular das moléculas analisadas, e verificou-se uma redução de 11% na percentagem relativa da expressão de CD25 em células T e uma diminuição na expressão de CD71 em células T, T CD4 e T CD8 de 39%, 32% e 42%, respectivamente, após sessão de HD. Assim, apesar de não ocorrer diferenças na percentagem de células T que expressem estes dois marcadores, verifica-se uma diminuição do número destes marcadores por célula com a sessão de HD. O marcador de activação CD71 é o receptor da transferrina e liga o complexo Fe(APO)-transferrina por endocitose, entregando o ferro, um importante co-factor de enzimas necessárias ao crescimento celular e metabolismo. Consistentes com esta análise estão os resultados das últimas análises feitas antes da colheita de sangue dos doentes, onde se verifica que aproximadamente 82% dos doentes apresentam valores de transferrina abaixo dos valores de referência (200-360 mg/mL). Apesar do valor de MFI, depois da sessão de HD, não

se ter alterado significativamente relativamente às células T CD25, obteve-se um valor de p próximo de 0,05 ($p=0,054$), podendo ser indicador de que há uma tendência para este valor diminuir, e para confirmar esta hipótese seria necessário um valor superior de voluntários, para uma mais correcta verificação da diferença de valores após a HD.

Os doentes com nefropatia diabética apresentam um elevado número de processos inflamatórios, tendo sido já demonstrado que ocorre um aumento destes processos com a sessão de HD [Kamel *et al*, 2009]. As citocinas que estão envolvidas neste processo são libertadas durante a sessão de hemodiálise, principalmente por monócitos e factores responsáveis pela activação de monócitos, como endotoxinas que possam estar no fluido dialisado; complemento activado; e a própria membrana do dialisador [Pertosa *et al*, 1995]. Tarakçioflu e seus colegas reportaram que a concentração serológica de IL-6, no soro, não sofre alterações significativas após a sessão de HD, resultado este que não se encontra concordante com os resultados do presente estudo. No entanto, o estudo destes investigadores, de uma amostra total de 29 doentes, somente 6 tinha como etiologia a diabetes *mellitus*. De facto, autores como Geerlings e seus colegas reportaram que um aumento dos níveis de IL-6 é característico de doentes com diabetes *mellitus* e encontra-se associada à resistência à insulina. Outros investigadores analisaram também que hiperglicémia com simultânea inibição da secreção de insulina endógena resulta num aumento dos níveis desta citocina [Esposito *et al*, 2002], levando posteriormente à activação de proteínas de fase aguda, supressão da síntese de albumina e aumento da proliferação de células B e T, contribuindo posteriormente, para a síntese de IL-2 [Schaefer *et al*, 1991]. Para além destas alterações, outros autores, como Petersen e seus colegas e Ropelle e seus colegas, reportaram que a IL-6 induz um ambiente anti-inflamatório pela indução da produção da citocina IL-10 e pela inibição da produção de TNF- α . Esta situação verifica-se também no nosso estudo, onde após hemodiálise temos um aumento da concentração de 19% para a IL-6 e 5% para a IL-10, onde não se verificam também diferenças na concentração de TNF- α . O aumento da citocina IL-10 é uma evidência do estado de activação dos monócitos e linfócitos em doentes em HD, muito provavelmente devido também ao contacto do sangue com a membrana do dialisador durante a sessão de hemodiálise, como referido anteriormente. A IL-10 é um dos mais importantes mediadores para diminuir a resposta inflamatória, em que um aumento destes níveis parece funcionar como mecanismo regulador para o controlo de urémia e activação induzida pela diálise [Girndt *et al*, 2003], assim a IL-10 actua como citocina anti-inflamatória, onde inibe as também citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-8, envolvidos na activação de granulócitos, monócitos/macrófagos e células NK, T e B [Steensberg *et al*, 2003]. Este facto é também consistente com os nossos resultados, onde não ocorrem diferenças significativas na concentração de IL-1 β e TNF- α , após a hemodiálise, e onde ocorre uma diminuição de 22% da concentração de IL-8, após a hemodiálise. A diminuição da concentração desta citocina é concordante também com os resultados reportados por Tarakçioflu e seus colegas. Outros dos possíveis motivos, também sugeridos

por estes investigadores são: o facto de que esta proteína tem um peso molecular baixo, sendo por isso fácil a sua difusão através da membrana de diálise; ou devido a uma diminuição da estabilidade ou alteração na sua absorção pela membrana, durante a sessão de hemodiálise.

Relativamente ao facto das concentrações das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-12p70 não apresentarem diferenças significativas, pode ser devido a limitações de metodologia, pois a maioria dos valores pré e pós diálise apresentaram valores séricos mais baixos que o limite de detecção da técnica utilizada. No entanto, o intervalo de valores detectáveis, pelo CBA, é bastante amplo, 20 a 5000 pg/mL, tornando-se importante determinar se valores inferiores a 20 pg/mL podem ser ou não fisiologicamente relevantes. Uma limitação do presente estudo relativa à análise de citocinas inflamatórias é o número de amostras (n=15 para IL-6 e IL-8 e n=13 para a IL-10). Para a verificação da consistência destes resultados, torna-se necessário incluir um maior número de amostras e incluir mais sessões de hemodiálise.

Capítulo 5

Conclusão

Através da realização deste estudo concluiu-se que durante uma sessão de hemodiálise ocorrem algumas alterações no Sistema Imunológico, nomeadamente na expressão de alguns marcadores de activação em células T e suas sub-populações (CD4 e CD8). Verificou-se assim que a hemodiálise interferiu na expressão do marcador CD25 em células T e T CD8, e na expressão de CD69 em células T. Verificou-se também que após uma sessão de hemodiálise a densidade das moléculas de CD71 diminuiu por célula, em células T, bem como as moléculas de CD25 em células T CD4. Além disso também se verifica que a sessão de hemodiálise altera a secreção de algumas citocinas, ocorrendo o aumento de IL-10 e IL-6 e uma diminuição da concentração de IL-8, após uma sessão de hemodiálise, sugerindo que possivelmente estas alterações se devam ao contacto com a membrana do dialisador. Apesar disso, o facto de se verificar um aumento de IL-10, durante a sessão de hemodiálise, este tem um efeito anti-inflamatório, pode ser indicativo de que este tipo de tratamento melhora alguns sinais característicos deste tipo de doentes. Um dos outros objectivos seria a análise da apoptose celular em linfócitos, após a sessão de hemodiálise, mas os resultados foram inconclusivos, não tendo por isso sido possível atingir este objectivo.

Capítulo 6

Perspectivas futuras

Apesar dos poucos estudos publicados nesta área, resultados contraditórios têm vindo a ser reportados, no que respeita aos efeitos da hemodiálise no Sistema Imunológico dos doentes com nefropatia diabética. Deste modo, mais estudos necessitam de ser feitos para uma melhor compreensão dos mecanismos induzidos pela hemodiálise que originam alterações na imunologia celular. Uma vez que verificámos no nosso estudo uma acção da hemodiálise no fenótipo das células T citotóxicas, CD8+, diferente relativamente às células T auxiliares, CD4+, mais estudos necessitam de ser realizados de modo a analisar também a função citotóxica destas células. É também importante realizar estudos sobre o efeito da hemodiálise na proliferação celular das células T e suas sub-populações, para melhor avaliarmos as consequências da HD na capacidade de resposta a antígenos. Uma vez que os nossos resultados referentes à apoptose celular foram inconclusivos, futuras experiências terão também de focar este aspecto nas sub-populações de linfócitos T. Para verificação da consistência dos nossos resultados será necessário também aumentar o número de amostras, bem como efectuar o estudo num maior número sessões de diálise.

Capítulo 7

Bibliografia

Abbas A, Lichtman A and Pillai S, Cellular and molecular immunology, 6th Edition, Saunders Elsevier: p.189-195; 528-531, 2007

Alvarez-Lara M, Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Madueño J and Aljama P, "The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uraemia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset", *Nephrology dialysis transplantation*, 19:3084-30-90, 2004

Ando M, Shibuya A, Yasuda M, Azuma N, Tsuchiya K, Akiba T and Nitta K, "Impairment of innate cellular response to in vitro stimuli in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis", *Nephrology Dialysis transplantation*, 20:2497-2503, 2005

Ankersmit H, Deicher R, Moser B, Teufel I, Roth G, Gerlitz S, Itescu S, Wolner E, Boltz-Nitulescu G and Kovarik J, "Impaired T cell proliferation, increase soluble death-inducing receptors and activation-induced T cell death in patients undergoing haemodialysis", *Clinical Experimental Immunology*, 125:142-148, 2001

Arosa F, Cardoso E and Pacheco F, Fundamentos de imunologia, 1º edição, Lidel: p. 35-60; 127-145, 2007

Belchetz P and Hammond P, Diabetes and Endocrinology, *Mosby*, p. 21-58; 101-107, 2003

Blicklé JF, Douce J, Krummel T and Hannedouche T, "Diabetic nephropathy in the elderly", *Diabetes & Metabolism*, 33:S40 - S55, 2007

Boner G and Cooper M, Management of diabetic nephropathy, 1st Edition, Martin Dunitz: p. 1-24; 37-51, United Kingdom, 2003

Borges A, Borges M, Fernandes J, Nascimento H, Sameiro-Faria M, Miranda V, Reis F, Belo L, Costa E and Santos-Silva A, "Apoptosis of peripheral CD4+ T-lymphocytes in end-stage renal disease patients under hemodialysis and rhEPO therapies", *Renal Failure*, 33 (2): 138-143(6), 2011

Bradran A and Nasri H, "Association between white blood cell count and levels of serum homocysteine in ESRD patients treating with hemodialysis", *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, Vol. 18, No. 1, 2006

Brunet P, Capo C, Dellacasagrande J, Thirion X, Mege J and Berland Y, "IL-10 synthesis and secretion by peripheral blood mononuclear cells in haemodialysis patients", *Nephrology dialysis, transplantation*, 13:1745-17-51, 1998

Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris A, De Francesco M, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A and Turano A, "Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation", *Cytometric*, 27:71-76, 1997

Correia, G" Resultados do estudo da prevalência da diabetes em Portugal (PREVADIAB - 2009)", *Anamnesis*, 18 (182): 27, 2009

Costa E, Lima M, Alves J, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Faria M, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L and Santos-Silva A, "Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy", *Journal of Clinical Immunology*, 28:268-275, 2008

d'Angeac A, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Reme T and Salmon M, "CD57+ T lymphocytes are derived from CD57-percursors by differentiation occurring in late immune responses", *European Journal of Immunology*, 24:1503-1511, 1997

Daichou Y, Kurashige S, Hashimoto S and Suzuki S, "Characteristic Cytokine Products of Th1 and Th2 Cells in Hemodialysis Patients", *Nephron*, 83:237-245, 1999

Descamps-Latscha B and Herbelin A, "Long term dialysis and cellular immunity: a critical survey", *Kidney International*, 41 (Suppl 2):S135-S142, 1993

Descamps-Latscha B and Jungers P, "New molecular aspects of chronic uremia and dialysis-related immunocompetent cell activation", *Nephrology Dialysis Transplantation*, 11 (Suppl 2):S121-S124, 1996

Dietzmann J, Thiel U, Ansorge S, Neumann K and Tager M, "Thiol-inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy", *Free radical biology & medicine*, 33 (10):1347-1354, 2002

Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Guagliaro L, Ceriello A and Giugliano D, “Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress”, *Circulation*, 106:2067-2072, 2002

Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J and Loscalzo J, Harrison Medicina Interna, 17ª Edição, Mcgraw Hill: p. 1752, 1770, 2009

Feehally J, Floege J and Johnson R, Comprehensive clinical nephrology, 3rd Edition, Elsevier, Philadelphia: p. 755-786; 813-831; 941-991, 2007

Fernandez-Fresnedo G, Ramos M, Gonzalez-Pardo M, de Francisco A, Lopez-Hoyos M and Aris M, “B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2”, *Nephrology dialysis transplantation*, 15:502-510, 2000

Fodor B, Ladányi E, Aleksza M, Takács M, Lakos G, Árkossy O, Koós A, Nagy A, Széll J, Klenk N, Sárváry E and Sipka S, “No Effect of Transfusion Transmitted Virus Viremia on the Distribution and Activation of Peripheral Lymphocytes in Hemodialyzed Patients”, *Nephron*, 92:933-937, 2002

Geerlings S and Haepelman A, “Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM)”, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26:259-265, 1999

Girndt M, Kaul H, Sester U, Leitnaker C, Sester M and Kohler H, “Selective sequestration of cytokine producing mononuclear cells during hemodialysis treatment”, *Journal of American Society Nephrology*, 8:236, 1997

Girndt M, Kohler H, Schiedhelm-Weick E, Meyer zum Büschenfelde K and Fleischer B, “T cell activation defect in hemodialysis patients: Evidence for a role of the B7/CD28 pathway”, *Kidney International*, 44:359-365, 1993

Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H and Kohler H, “Molecular aspects of T- and B - cell function in uremia”, *Kidney international*, 59 (Suppl. 78):S-206 - S-211, 2001

Girndt M, Sester U, Kaul H and Köhler H, “Production of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single-cell level”, *Journal of American Society Nephrology*, 9:1689-1696 125, 1998

Girndt M, Sester U, Sester M, Kaul H and Kohler H, “Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect”, *Kidney International*, 59:1382-1389, 2001

Girndt M, Sester U, Sester M, Kaul H and Kohler H, “Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure”, *Nephrology dialysis transplantation*, 14:2807-2810, 1999

Girndt M, Ulrich C, Kaul H, Sester U, Sester M and Hohler H, “Uremia-associated immune defect: The IL-10 - CRP axis”, *Kidney International*, 63(84): S76-S79, 2003

Grassmann A, Gioberge S, Moeller S and Brown G, “ESRD patients in 2004: global overview of patients numbers, treatment modalities and associated trends”, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20:2587-2593, 2005

Greenfield E, Nguyen K and Kuchroo V, “CD28/B7 costimulation: A review”, *Critical Reviews in Immunology*, 18:389-418, 1998

Guyton A and Hall J, *Textbook of Medical Physiology*, 11th Edition, Elsevier Saunders: p.307-381, 2006

Hajishengallis G and Lambris j, “Crosstalk pathways between toll-like receptors and the complement system”, *Trends in Immunology*, 31 (4): 154-163, 2010

Hendriks T, Gurp E, Mol W, Schoordijk W, Sewgobind V, Ijzermans J, Weimar W and Baan C, “End-stage renal failure and regulatory activities of CD4⁺CD25^{bright}FoxP3⁺ T-cells”, *Nephrology dialysis transplantation*, 24: 1969-1978, 2009

Herbelin A, Nguyen A, Zingraff J, Ureña P and Descamps-Latscha B, “Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor α ”, *Kidney International*, 37:116-125, 1990

Kamel L, Morsy A and Shamaa A, “T-cell cytokine production and endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with nephropathy”, *Eastern Mediterranean Health Journal*, 15 (4):807-816, 2009

Kato A, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P and Lindholm B, “Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease”, *American society of nephrology*, 3:1526-1533, 2008

Kaul H, Girndt M, Sester U, Sester M and Kohler H, “Initiation of hemodialysis treatment leads to improvement of T-cell activation in patients with ESRD”, *American Journal of Kidney Diseases*, 35(4):611-616, 2000

Kher V, “End-stage renal disease in developing countries”, *Kidney International*, 62:350-362, 2002

- Kimmel P, Phillips T, Simmens S, Peterson R, Weihs K, Alleyne S, Cruz I, Yanovski J and Veis J, "Immunologic function and survival in hemodialysis patients", *Kidney International*, 54:236-244, 1998
- Kimura A and Kishimoto T, "Th17 cell in inflammation", *International Immunopharmacology*, 11: 319-322, 2011
- Kurz P, Kohler H, Meuer S, Hutteroth T and Meyer zum Buschenfelde K, "Impaired cellular immune response in chronic renal failure: evidence for a T cell defect", *Kidney International*, 29:1209-1214, 1986
- Libetta C, Rampino T and Canton A, "Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients", *American Journal of Kidney Diseases*, 38:286-295, 2001
- Litjens N, Druningen C and Betjes M, "Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naïve T lymphocytes", *Clinical Immunology*, 118: 83-91, 2006
- Litjens N, van Druningen C and Betjes M, "Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naïve T lymphocytes", *Clinical Immunology*, 118:83-91, 2006
- Mak R, "Intravenous 1,25-dihydroxycholecalciferol corrects glucose intolerance in hemodialysis patients", *Kidney International*, 41:1049-1054, 1992
- Meier P and Blanc E, "Plasma level of soluble Fas is an independent marker of cardiovascular disease in ESRD patients", *Kidney International*, 64:1532-1533, 2003
- Meier P, Dayer E, Blanc E and Wauters J, "Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease", *Journal of American Society Nephrology*, 13:204-212, 2002
- Meier P, Spertini F, Blanc E and Burnier M, "Oxidized Low-density lipoproteins activate CD4+ T cell apoptosis in patients with ESRD through Fas engagement", *American society of nephrology*, 18:331-342, 2007
- National Kidney Foundation: American Journal of Kidney Disease 39 (2 Suppl. 1): S1: 2002, citado por: Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J and Loscalzo J, Harrison Medicina Interna, 17ª Edição, Mcgraw Hill: p. 1752-1770, 2009
- Nitta K, Akiba T, Kawashima A, Kimata N, Miwa N, Nishida E, Uchida K, Honda K, Yumura W and Nihei H, "Characterization of Th1/Th2 Profile in Uremic Patients", *Nephron*, 91:492-495, 2002

- Pertosa G, Gesualdo L, Bottalico D and Schena FP, "Endotoxins modulate chronically tumor necrosis factor- α and interleukin-6 release by uremic monocytes", *Nephrology dialysis transplantation*, 10:328-333, 1995
- Petersen A and Pedersen B, "The anti-inflammatory effect of exercise", *Journal of Applied physiology*, 98:1154-1162, 2005
- Rabinovitch A, "Immunoregulatory and cytokine imbalance in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation", *Diabetes*, 43:613-621, 1994
- Rapoport M, Mor A, Vardi P, Ramot Y, Winker R, Hindi A and Bistritzer T, "Decrease secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokine in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus", *Journal of autoimmunity*, 11:635-642, 1998
- Ropelle E, Flores M, Cintra D, Rocha G, Pauli J, Morari J, Souza C, Moraes J, Prada P, Guadagnini D, Marin R, Oliveira A, Augusto T, Carvalho H, Velloso L, Saad M and Carvalheira J, "IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition", *Plos Biology*, 8 (8):1-20, 2010
- Schaefer R, Paczek L and Heidland A, "Cytokine production by monocytes during hemodialysis", *Nephrology dialysis transplantation*, 6(Suppl 2): 14-17, 1991
- Schieppati A and Remuzzi G, "Chronic renal disease as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications", *Kidney International Supplement*, 68:7-10, 2005
- Sester U, Sester M, Hauk M, Kaul H, Kohler H and Girndt M, "T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients", *Nephrology dialysis transplantation*, 15:1217-1223, 2000
- Shrishrimal K, Hart P and Michota F, "Managing diabetes in hemodialysis patients: observations and recommendations", *Cleveland clinic journal of medicine*, 76(11):649-655, 2009
- Smith-Garvin J, Koretzky G and Jordan M, "T cell activation", *Annual Review in Immunology*, 27:591-619, 2009
- Steensberg A, Fisher C, Keller C, Moller K and Pedersen K, "IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans", *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285:E433-E437, 2003

- Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson R, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T and Girndt M, “IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia-the good, the bad, and the ugly”, *Kidney International*, 67:1216-1233, 2005
- Tarakçioğlu M, Erbagci A, Usalan C, Deveci R and Kocabas R, “Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines”, *Mediators of Inflammation*, 12: 15-19, 2003
- Vrabie C, Petrescu A, Waller M, Cojocaru M, Ciocalte, A and Dina I, “Inflammatory, degenerative and vascular lesions in long-term dialysed patients”, *Romanian Journal of Internal Medicine*, 47:149-159, 2009
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R and King H, “Global prevalence of diabetes”, *Diabetes Care*, 27:1047-1053, 2004
- Yoon J-W, Gollapudi S, Pahl MV and Vaziri ND, “Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease”, *Kidney International*, 70: 371-376, 2006
- Zamauskaite A, Perez-Cruz I, Yaqoob M, Madrigal J and Cohen S, “Effect of renal dialysis therapy modality on T cell cytokine production”, *Nephrology dialysis transplantation*, 14:49-55, 1999
- Zhu J and Paul W, “CD4 T cells: fates, functions, and faults”, *Blood*, 112:1557-1569, 2008

Capítulo 8

Cibergrafia

The United States Renal Data System, Annual Data Report 2010, “<http://www.usrds.org>” (05 de Junho de 2011)

www.leechestherapy.com/kidney_disease.php (14 de Fevereiro de 2011)

www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/4747F2BE-D534-4983-9A94-C5B7066C9731/0/i012326.pdf (12 de Junho de 2011)

www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/7F3052FA-7955-4C10-B40D-45043C0407EC/0/09_NCD.pdf (14 de Fevereiro, 2011)